

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Jaromír Hamet

Fyziologický základ tolerance rostlin rodu *Fragaria* k abiotickým stresům.

The physiological basis of abiotic stress tolerance in *Fragaria* genus plants.

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Helena Lipavská, PhD.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování:

Rád bych poděkoval zejména mé školitelce Doc. RNDr. Heleně Lipavské, PhD. za odborný dohled, cenné rady a zejména vstřícnost a ochotu při vedení mé diplomové práce. Další dík patří mým konzultantkám RNDr. Haně Konrádové, PhD. a RNDr. Petře Maškové, PhD. i celému týmu laboratoře 007, za věcné připomínky, obětavou pomoc a vytvoření přátelské atmosféry.

V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat své rodině a přítelkyni, za podporu a trpělivost, bez které by tato práce mohla jen těžko vzniknout.

Abstrakt

Abiotické stresy - sucho, zasolení, extrémní teploty - způsobují morfologické a fyziologické změny omezující růst, vývoj a produktivitu rostlin. Zásadní dopad mají u hospodářských plodin, kde snižují výnosy často až o 50 %. Rostliny vyvinuly mnoho obranných mechanismů zajišťujících určitou míru tolerance k abiotickým stresům, mezi které nepochybně patří i změny v sacharidovém metabolismu. Podstata těchto změn ale zatím není zcela objasněna, nadto většina poznatků byla získána studiem modelových druhů a málo je známo o jejich platnosti u rostlin hospodářsky využívaných. Tato práce byla proto zaměřena na rostliny jahodníku obecného (*Fragaria vesca* L.), patřící do hospodářsky významné čeledi *Rosaceae*. Kontrolované podmínky a cílené působení stresových faktorů byly zajištěny kultivací rostlin *in vitro*. Celistvé rostliny jahodníku i kalusové kultury byly vystaveny jednotlivým stresům i jejich vzájemné kombinaci, odrážející lépe reálné podmínky. V různých fázích stresové reakce byly sledovány růstové charakteristiky, změny v obsahu a spektru rozpustných sacharidů a úroveň oxidativního stresu a byly porovnány s rostlinami rostoucími v optimálních podmínkách. Odpověď jahodníků na abiotické stresy byla velmi nehomogenní, což ztěžovalo získání statisticky významných výsledků. Jedinou průkaznou reakcí bylo zvýšení poměru obsahu hexos k obsahu sacharosy při působení osmotického stresu. Při působení stejného typu stresu na kalusové kultury docházelo k průkaznému snížení celkového obsahu rozpustných sacharidů. Reakce těchto kultur se tedy ukázala být velmi odlišná od reakce celistvých rostlin.

Klíčová slova: abiotický stres, *Fragaria vesca*, *in vitro*, kalusové kultury, oxidativní stres, sacharidy

Abstract

Abiotic stresses - drought, salinity or extreme temperatures - cause morphological and physiological changes, affect growth, development and plant productivity. In crops, these limitations often reduce yields up to 50%. Plants have developed various mechanisms ensuring some degree of abiotic stress tolerance, which undoubtedly include changes in carbohydrate metabolism. The nature of many defense mechanisms is not yet fully understood, moreover, most findings were obtained by studying model plants and little is known about their validity in crops. This work was therefore focused on woodland strawberry (*Fragaria vesca* L.) from economically important family *Rosaceae*. Controlled conditions and targeted exposure to stress factors was obtained through the cultivation *in vitro*. Strawberry plants and callus cultures were exposed to various stresses and their combinations, better reflecting the natural conditions. At various stages of stress reaction, growth characteristics, changes in the content and the spectrum of soluble carbohydrates and oxidative stress levels were monitored and compared with plants growing under optimal conditions. Abiotic stress responses of strawberry plants were very inhomogeneous, which complicated the obtaining of statistically significant results. The only significant response was the increase in the hexose to sucrose content ratio during osmotic stress. When exposed to the same type of stress, however, the callus cultures reacted by significant reduction of the total soluble carbohydrate content. Response of these cultures thus proved to be very different from the reaction of whole plants.

Key words: abiotic stress, callus cultures, carbohydrates, *Fragaria vesca*, *in vitro*, oxidative stress

Seznam zkratk

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
ADH	alkoholdehydrogenasa
ANOVA	(analysis of variance) analýza rozptylu jednoduchého třídění
BAP	6-benzylaminopurin
BHT	butylovaný hydroxytoluenu
CBF/DREB	C-repeat binding factor/dehydration responsive element binding protein
COR47	(cold regulated 47) kyselý dehydrin
dH ₂ O	deionizovaná voda
DW	(dry weight) suchá hmotnost
F6P	fruktosa-6-fosfát
FW	(fresh weight) čerstvá hmotnost
G6P	glukosa-6-fosfát
GA3	kyselina gibberelová
Gal6P	galaktosa-6-fosfát
HPLC	(high-performance liquid chromatography) vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSP	heat shock proteiny
ICE1	inducer of CBF expression 1
LEA	late embryogenesis abundant
LHC	(light harvesting complex) světlosběrný komplex
LT ₅₀	teplota při které přežívá 50 % rostlin (popřípadě orgánů, pletiv, atd.)
Man6P	manosa-6-fosfát
MDA	malondialdehyd
MS	(Murashige a Skoog) základní kultivační medium
MS-0	MS medium bez sacharosy
NAA	kyselina naftyloctová
PEG	polyethylenglykol
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
ROS	(reactive oxygen species) reaktivní formy kyslíku
RuBisCO	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa
SPS	sacharosafosfátsynthasa
TBA	kyselina thiobarbiturové
TCA	kyselina trichloroctová
TDZ	thidiazuron (1-fenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) močovina)
WC	(water content) obsah vody v rostlinách
WCOR410	(wheat cold regulated 410) kyselý dehydrin z pšenice
XERO2	bazický dehydrin

Obsah

1. Úvod	9
2. Literární úvod	11
2.1. Modelový organismus <i>Fragaria vesca</i>	11
2.2. Reakce jahodníku na snížené teploty	12
2.3. Reakce jahodníku na nedostatek vody	15
2.4. Mechanismy zvyšující odolnost k vybraným abiotickým stresům	16
2.4.1. Akumulace sacharidů	17
2.4.2. Akumulace dalších metabolitů	20
2.5. Kombinace stresů	23
3. Materiál a metody	25
3.1. Kultivační medium	25
3.1.1. Zásobní roztoky solí a vitamínů	25
3.1.2. Příprava media ze zásobních roztoků	26
3.1.3. Zásobní roztoky růstových regulátorů	27
3.2. Kultivace rostlinného materiálu	27
3.2.1. Výsev semen <i>in vitro</i>	27
3.2.2. Udržovací kultivace rostlin	28
3.2.3. Vegetativní množení <i>in vitro</i>	28
3.2.4. Odvození a udržování kalusové kultury	29
3.2.5. Sterilizace nástrojů a materiálu	29
3.3. Experimentální ošetření	30
3.3.1. Úpravy medií pro experimenty	30
3.3.2. Výroba a použití uzávěrů kultivačních nádob sun cap	31
3.4. Přehled uspořádání experimentů	31
3.4.1. Experimenty s rostlinami	31
3.4.2. Experimenty s kalusy	33
3.5. Odběr materiálu	35
3.5.1. Fotografování	35
3.5.2. Odběr rostlin	35
3.5.3. Odběr kalusů	35
3.6. Stanovení růstových charakteristik	35
3.7. Analýza obsahu nestrukturních sacharidů	36
3.7.1. Příprava vzorků pro analýzu nestrukturních sacharidů	36

3.7.2. Stanovení obsahu a spektra nestrukturních sacharidů	37
3.8. Analýza obsahu malondialdehydu (MDA).....	37
3.8.1. Příprava vzorků pro měření obsahu MDA.....	37
3.8.2. Stanovení obsahu MDA.....	38
3.9. Zpracování dat.....	39
4. Výsledky	40
4.1. Optimalizace podmínek kultivace rostlin <i>Fragaria vesca in vitro</i>	40
4.2. Vegetativní množení rostlin	41
4.2.1. Indukce regenerace prýtů z listových segmentů pomocí thidiazuronu.....	41
4.2.2. Zmnožení prýtů rostliny indukované pomocí 6-benzylaminopurinu a kyseliny giberelové	41
4.3. Vliv působení abiotického stresu na vybrané charakteristiky rostlin <i>F. vesca</i>	42
4.4. Vliv aplikace validamycinu A na vybrané parametry rostlin <i>F. vesca</i>	50
4.5. Vliv fotoautorofní kultivace <i>in vitro</i> na vybrané parametry rostlin	52
4.6. Odvození a kultivace kalusové kultury	54
4.6.1. Indukce tvorby kalusu pomocí kyseliny naftyloctové a 2,4-dichlorfenoxyoctové.	54
4.6.2. Indukce tvorby kalusu pomocí kyseliny naftyloctové a 6-benzylaminopurinu.....	54
4.6.3 Vlivu typu exogenního sacharidu na vybrané charakteristiky kalusových kultur <i>F. vesca</i>	55
4.7. Vliv působení abiotického stresu na vybrané charakteristiky kalusových kultur <i>F. vesca</i>	56
4.8. Vliv aplikace validamycinu A na vybrané charakteristiky kalusové kultury <i>F. vesca</i> .	61
5. Diskuse.....	62
6. Závěry	70
7. Seznam použité literatury.....	71

1. Úvod

Sucho a extrémní teploty patří k nejčastějším abiotickým stresům působícím na rostliny po celém světě. Různé druhy rostlin vyvinuly v průběhu evoluce mnoho obranných mechanismů, díky kterým i v těchto nepříznivých podmínkách udržují základní životní funkce. K plnému porozumění obranných mechanismů je nutné znát stresovou odpověď na molekulární, buněčné i orgánové úrovni, a to včetně jejího průběhu v čase. V přirozených podmínkách bývají navíc rostliny vystaveny více stresům zároveň, a ačkoliv je již poměrně dlouho známo, že odpověď rostlin na kombinaci stresů se může kvalitativně lišit od odpovědi na stresy působící jednotlivě, většina prací zabývajících se stresovou odolností rostlin zkoumá pouze vliv jednotlivých stresů a ne jejich kombinace. Pro člověka je jedním z největších problémů způsobených abiotickými stresy snižování výnosů zemědělských plodin nebo dokonce nemožnost jejich pěstování na určitém území. Poznání mechanismů odolnosti rostlin je nutným předpokladem vzniku nových kultivarů rostlin (ať už klasickým šlechtěním nebo pomocí genového inženýrství), které by zajišťovaly dostatečný výnos i v nepříznivých podmínkách.

Tato práce je zaměřena zejména na změny v sacharidovém metabolismu rostlin, které nepochybně hrají důležitou roli ve stresové odpovědi. Sacharidy totiž slouží nejen jako zásoba energie a uhlíku, ale mohou také fungovat jako osmolyty, zhášeče reaktivních forem kyslíku a v neposlední řadě mají také signální funkci. Zvolený experimentální materiál, jahodník obecný (*Fragaria vesca*), není z hlediska zapojení rozpustných sacharidů ve stresové odpovědi příliš podrobně prozkoumán. A vzhledem k tomu, že se v posledních letech stává modelovou rostlinou pro celou čeleď *Rosaceae* a obliba jeho využití jako experimentálního materiálu stále roste, získané poznatky mohou najít široké uplatnění v dalším výzkumu.

Cíl práce

U modelové rostliny čeledi *Rosaceae* jahodníku obecného (*Fragaria vesca* L.) sledovat změny v sacharidové bilanci, vyvolané působením abiotických stresů.

Dílčí cíle:

- Vypracovat postup množení a kultivace rostlin jahodníku v podmínkách *in vitro*
- Vypracovat postup indukce a kultivace kalusové kultury jahodníku v podmínkách *in vitro*
- Sledovat změny v obsahu a spektru rozpustných sacharidů za vybraných stresových podmínek u rostlin a kalusových kultur v podmínkách *in vitro*
- Sledovat vliv působení validamycinu A na růst a změny v obsahu a spektru rozpustných sacharidů při optimálních podmínkách a stresových ošetřeních
- Vypracovat postup kultivace jahodníku v podmínkách *in vitro* za fotoautotrofních podmínek

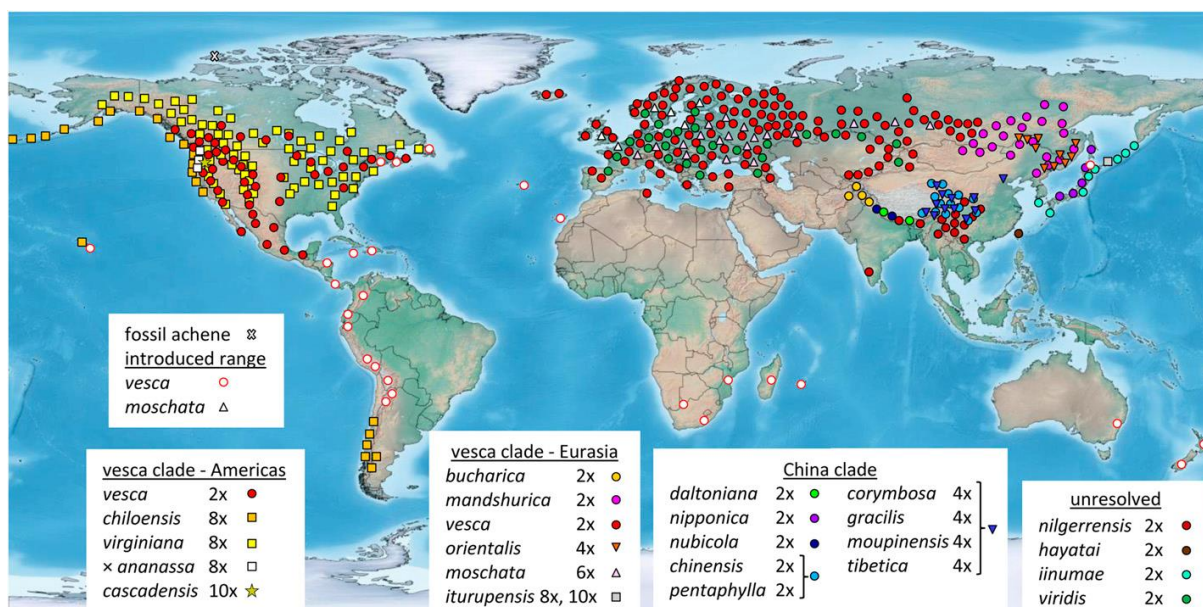
Hypotézy

- 1) Reakce rostlin *F. vesca* na vybrané abiotické stresy zahrnuje změny v obsahu a spektru rozpustných sacharidů.
- 2) Podobné reakce na tyto stresy lze pozorovat i u kalusových kultur.
- 3) Reakce na působení kombinace abiotických stresů nepředstavuje jen sumu reakcí na jednotlivě působící stresy, ale novou kvalitu stresové reakce.
- 4) Změna obsahu trehalosy způsobí komplexní změnu metabolismu vedoucí ke zvýšení odolnosti.

2. Literární úvod

2.1. Modelový organismus *Fragaria vesca*

Rod *Fragaria*, spadající do čeledi *Rosaceae*, zahrnuje 20 divokých druhů, 3 přirozeně se vyskytující hybridní druhy a 2 komerčně pěstované hybridní druhy vytvořené člověkem (*Fragaria* × *ananassa* Duch. ex Lamarck a *Fragaria* × *vescana* R. Bauer & A. Bauer), které patří mezi nejmladší domestikované rostliny. Tento rod se také vyznačuje velkou variabilitou ploidních úrovní, které dosahují hodnot 2n, 4n, 6n, 8n a 10n vzácně i 5n a 9n (Liston et al. 2014; Hummer et al. 2011). Areál rozšíření divokých druhů zasahuje na všechny kontinenty kromě Antarktidy (obr. 1) a jednotlivé druhy rostou v široké škále ekologických podmínek (Darrow 1966).



Obrázek 1: Ploidie a přibližné geografické rozšíření jednotlivých druhů z rodu *Fragaria*.

Převzato z Liston et al. (2014).

Komerčně nejvíce využívaný oktaploidní druh *F. × ananassa* vznikl zkřížením dvou divokých oktaploidních druhů *Fragaria virginiana* Duch. a *Fragaria chiloensis* Duch. rostoucích v Americe (Zhang & Archbold 1993). Oba tyto druhy vznikly allopolyploidizací a jedním z jejich předků je velmi pravděpodobně diploidní *Fragaria vesca* L. neboli jahodník obecný (Rousseau-Gueutin et al. 2009), který má ze všech druhů v tomto rodu nejširší rozšíření (Liston et al. 2014; Darrow 1966). Jahodník obecný se v poslední době stává velmi oblíbeným modelovým materiálem pro celou čeleď *Rosaceae*. Jeho výhodami jsou například

relativně malý vzrůst a krátká generační doba v porovnání s ostatními vytrvalými rostlinami ze stejné čeledi, dále snadné vegetativní i generativní množení a jednoduchost kultivace v kontrolovaných podmínkách (Davik et al. 2013; Rivarola et al. 2011; Shulaev et al. 2011). Nemalou výhodou je také zvládnutá genetická transformace, umožňující produkování mutantních linií (Oosumi et al. 2006). Jahodník obecný má poměrně malý genom (240 Mb, $2n = 2x = 14$), který byl již před několika lety osekvenován (Shulaev et al. 2011). Nedávno byly navíc osekvenovány i genomy *F. × ananassa*, *F. iinumae*, *F. nipponica*, *F. nubicola*, a *F. orientalis* (Hirakawa et al. 2014). Také byla prokázána vysoká míra podobnosti mezi genomy *F. vesca* a *F. × ananassa*, což ukazuje, že při polyploidizaci ani hybridizaci nedošlo k výrazným chromozomálním přestavbám (Rousseau-Gueutin et al. 2008). Je tedy pravděpodobné, že i metabolické regulace budou u obou druhů podobné (Rohloff et al. 2012). To by umožňovalo dobře aplikovat poznatky získané studiem *F. vesca* i na komerčně využívané kultivary *F. × ananassa*.

2.2. Reakce jahodníku na snížené teploty

Nízké teploty jsou jedním z abiotických stresů, kterému musí v průběhu svého života čelit většina rostlin, zejména pak rostliny rostoucí ve vyšších zeměpisných šířkách, které zažívají v zimě poměrně dlouhé období snížených teplot. K jeho přečkání využívají různé strategie související s jejich životní formou (Raunkiaer 1934). U jahodníku, patřícího mezi vytrvalé rostliny, přezimují kořeny a zkrácený stonek s růstovým vrcholem. Ten bývá chráněn částečně přezimujícími nebo už odumřelými listy. Jejich přežívání ale není pro rostlinu podstatné, a tak při přípravě na zimu přesouvá asimiláty do stonku s růstovým vrcholem (Davik et al. 2013), který je nezbytný pro opětovný nárůst nadzemních orgánů po skončení zimy (Koehler et al. 2012).

Fyziologické změny způsobené postupným poklesem teploty, které zvyšují chladovou či mrazovou odolnost rostlin, jsou označovány jako chladová aklimace (Thomashow 2010). Tento proces začíná u rostlin mírného pásu na podzim, kdy se začíná výrazně zkracovat fotoperioda a teploty postupně klesají k nule, a vrcholí v zimě (Ruelland et al. 2009). Lze očekávat, že vzhledem k rozdílným životním strategiím jednoletých a vytrvalých druhů se budou lišit i jejich strategie chladové aklimace (Rohloff et al. 2012; Koehler et al. 2015). Většina studií zabývajících se odpovědí rostlin na chlad byla provedena na modelovém

organismu huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) (Davik et al. 2013), který je jednoletý a obvykle má velmi krátkou generační dobu. Problémy s výrazným chladovým stresem musí huseníček řešit, jen pokud se chová jako ozim, kdy přezimují mladé rostlinky. Ty se snaží zachovat si přes zimu co nejlépe funkční listy, které jim brzy z jara umožní rychlý nástup růstu a kvetení. Při přezimování ve formě semen a vyklíčení na jaře se tato rostlina období nejnižších teplot zcela vyhne. Pokud dojde ke snížení teplot během vegetační sezony, je velmi pravděpodobné, že se bude huseníček snažit především o vytvoření generativních orgánů. Potřebuje se proto vyrovnat s teplotním stresem v listech, aby zajistil dostatečnou úroveň fotosyntézy pro vytvoření asimilátů potřebných k tvorbě semen a úspěšné reprodukci (Rohloff et al. 2012).

I když jsou rostliny rodu *Fragaria* přizpůsobivé široké škále podmínek, jejich produktivita je výrazně limitována teplotou (Maughan et al. 2015). Některé druhy mohou přežívat v oblastech se značnými teplotními extrémy. Například *F. chiloensis* schopná přežít v centrální Kalifornii teploty přes 40 °C nebo naopak *F. virginiana* rostoucí na Aljašce, kde může teplota klesat až k -50 °C. Ovšem v případě takto nízkých teplot je pravděpodobné, že rostliny jahodníků jsou pokryty vrstvou sněhu a díky této izolaci stačí přezimujícím orgánům vyrovnat se s mírnějšími teplotními výkyvy (Darrow 1966). Není překvapením, že u divoce rostoucích druhů a ekotypů jahodníku byla také nalezena korelace mezi mrazovou odolností a zeměpisnou šířkou, ve které se přirozeně vyskytují (Davik et al. 2013; Sønsteby & Heide 2011). Kulturní druh *F. × ananassa* je poměrně málo tolerantní k nízkým teplotám (Palonen & Buszard 1997), což je pravděpodobně způsobeno tím, že nebyl šlechtěn na takové teplotní extrémy, jaké můžou zažívat divoké druhy na svých přirozených stanovištích. Jeho růstové optimum je mezi 20 a 26 °C a s klesající teplotou se růst zpomaluje (Darrow 1966). Nicméně určitá míra chladové tolerance byla i u kulturních druhů jahodníků již několikrát dokumentována. Po aklimaci jsou v zimě schopny přežívat dlouhodobě teploty několik stupňů pod bodem mrazu, doprovázené vznikem extracelulárního ledu a nasáváním vody z buněk do extracelulárních prostor (Warmund 1993; Rivarola et al. 2011; Koehler et al. 2012). Ledové krystaly tvoří v pletivech trhliny, které vznikají hlavně ve stonkové dřeni poblíž vodivých pletiv a pod růstovým vrcholem. Po zvýšení teploty a obnovení růstu rostliny, se začnou tyto trhliny díky dělení a zvětšování blízkých buněk vyplňovat a po několika měsících zcela zmizí (Warmund 1993).

Konkrétní teploty, které je *F. × ananassa* schopna přežívat, byly zjišťovány například ve studii Koehler et al.(2012). Kultivary ‘Jonsok‘ a ‘Frida‘ byly aklimovány 6 týdnů při 2 °C

a následně vystaveny 2 dny teplotám -6 a -9 °C. Sledováním hnědnutí pletiv a počtů uhynulých jedinců při těchto teplotách byla vytvořena křivka úhynu rostlin v závislosti na teplotě a z ní extrapolována hodnota TL_{50} (teplota, při které přežívá 50 % rostlin). Pro kultivar 'Jonsok' byla TL_{50} stanovena na -8,3 °C a pro kultivar 'Frida' -5,5 °C. Podobným pokusem byla hodnocena také mrazová odolnost u kultivarů 'Bounty' 'Korona' a 'Senga Sengana' (Nestby & Bjorgum 1999). Rostliny byly od října do února aklimovány při 0 °C, a poté jednorázově po dobu 2 hodin vystaveny teplotám -4, -8, -12 a -20 °C. Následně bylo podle hnědnutí pletiv a sledováním dalšího růstu a výnosů hodnoceno jejich poškození. Už při -8 °C došlo v průměru k více než 50% snížení výnosů. Kritická teplota pro závažné poškození byla u kultivarů 'Bounty' a 'Senga Sengana' mezi -8 a -12 °C a u kultivaru 'Korona' těsně pod -12 °C. Po vystavení nižším teplotám sice některé rostliny ještě nějaký čas rostly, ovšem časem došlo k jejich úhynu. Tyto hodnoty jsou v dobrém souladu s dříve publikovanými výsledky, kde byla u kultivaru 'Earliglow' stanovena minimální teplota pro přežívání na -12 °C (Warmund 1993). U kulturních jahodníků, přirozeně aklimovaných v polních podmínkách, bylo pozorováno silné poškození při -9 °C a limitní teplota pro přežití byla také přibližně -12 °C, s drobnými odchylkami v závislosti na konkrétním kultivaru (Darrow 1966). Dokonce i u divokého druhu *F. vesca* ssp. *vesca* ekotyp Alta, rostoucího v Norsku, byla nedávno po 6 týdenní aklimaci ve 2 °C určena podobná LT_{50} a to -11,6 °C (Davik et al. 2013). Ovšem již dříve byla u stejného druhu a ekotypu popsána výrazně vyšší odolnost (Sønsteby & Heide 2011). V závislosti na zeměpisné šířce, ze které populace pocházela, se LT_{50} pohybovala mezi -18 a -24 °C. Tyto hodnoty byly ale získány z rostlin aklimovaných v přirozených podmínkách od konce září do začátku prosince. U neaklimovaných rostlin byla LT_{50} přibližně -6 °C. Z těchto měření autoři také vyvozují, že k plnému otužení jahodníku je potřeba několik měsíců teplot blízkých 0 °C.

Jak již bylo řečeno, listy jahodníku zůstávají často zelené i v zimě, ale jejich přezimování není pro rostlinu podstatné. Proto není překvapením, že se ukázaly být citlivější ke sníženým teplotám než přezimující stonek. V nedávno publikované práci Maughan et al. (2015) bylo u listů *F. × ananassa* zjištěno výrazné snížení fotosyntetické aktivity (přibližně o 50 %) už po jedné noci při -5 °C, a její téměř úplná ztráta po opakovaném vystavení -5 °C nebo jedné noci při -9 °C. Ovšem při vystavení -3 °C ještě k žádným průkazným změnám ve fotosyntetické aktivitě listů nedocházelo, a navíc tato teplota už po jedné noci způsobila určitou míru aklimace a omezila poškození způsobené následným vystavením silnějšímu mrazu. K následnému obnovení fotosyntetické aktivity listů nedošlo ani po 28 dnech

kultivace v optimálních podmínkách. Lze najít i práce, které ukazují na mnohem vyšší chladovou odolnost listů. Například Turhan et al. (2012) uvádějí u kultivarů 'Diamante' a 'Aromas' průměrnou LT_{50} u neaklimovaných listů v létě $-13,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a u aklimovaných listů v zimě dokonce $-23,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tyto hodnoty byly ale získány měřením úniku elektrolytů v oddělených listech, a je tedy otázkou, do jaké míry mohly být při těchto teplotách ještě fyziologicky funkční. Velmi citlivé jsou u jahodníku zejména generativní orgány (Rivarola et al. 2011), které bývají vystaveny pouze slabým a krátkodobým jarním mrazům. U květů bylo zjištěno, že jejich přežívání mrazu je závislé především na přítomnost/absenci nukleárních jader, tedy zda vzniknou krystalky ledu nebo dojde k udržení vody v podchlazeném kapalném stavu. V přítomnosti nukleátoru byla většina květů poškozena už při $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, ovšem bez něho některé přežívaly až $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Hummel & Moore 1997).

2.3. Reakce jahodníku na nedostatek vody

Sucho je nejvýznamnějším abiotickým stresem omezujícím růst, vývoj, a tím i produkci plodin na celém světě. Pro zajištění dostatečné produkce potravin je velmi žádoucí minimalizovat rozdíl mezi výnosy v optimálních, a stresových podmínkách a zvýšit tak jejich stabilitu (Cattivelli et al. 2008). Omezení růstu a výnosů při suchu je spojeno hlavně s uzavírání průduchů a následným nedostatkem CO_2 a omezením fotosyntézy (Martínez-Ferri et al. 2016; Ghaderi & Siosemardeh 2011). Nedostatek vody také okamžitě ovlivňuje vodní status buněk a transport vody v rostlině spojený s příjmem anorganických látek i distribucí asimilátů (Murshed et al. 2013). Dále také dochází ke vzniku většího množství reaktivních forem kyslíku způsobujících oxidativní stres (Sharma & Dubey 2005).

Většina rostlin vyvinula mechanismy, které jim umožňují se stresu ze sucha alespoň částečně vyhnout nebo ho tolerovat (Ghaderi & Siosemardeh 2011; Chaves et al. 2002). Jahodníky, a to zejména ty kulturní, však v tomto ohledu patří spíše k méně adaptovaným rostlinám. Vzhledem k povrchovému kořenovému systému, velké listové ploše a vysokému obsahu vody v plodech mají velké nároky na dostupnost vody (Klamkowski & Treder 2006). Pokud nejsou tyto nároky splněny, dochází u jahodníků stejně jako u většiny jiných rostlin k negativním dopadům na fyziologický status rostliny. U *F. × ananassa* byl při nedostupnosti vody popsán pokles vodního potenciálu v listech korelující s intenzitou stresu (Sun et al. 2015; Ghaderi & Siosemardeh 2011; Razavi et al. 2008). Dále bylo pozorováno omezení vodivosti průduchů spojené s omezením transpirace a asimilace CO_2 . Ve všech těchto parametrech byl průkazný

rozdíl mezi kultivary (Ghaderi & Siosemardeh 2011). V neposlední řadě pak bylo u jahodníků vystavených osmotickému stresu zaznamenáno také zvýšení úrovně stresu oxidativního (Sun et al. 2015). Následně pak samozřejmě dochází ke snížení celkové hmotnosti biomasy a zejména listové plochy rostlin jahodníků (Razavi et al. 2008). Pro optimální výnosy vyžaduje jahodník ve většině oblastí dodatečné zavlažování, bez kterého často trpí vodním deficitem (Ghaderi & Siosemardeh 2011). I mírný nedostatek vody v období kvetení a růstu plodů pak způsobuje omezení jejich počtu (Martínez-Ferri et al. 2016) nebo velikosti (Liu et al. 2007). Nicméně míra redukce velikosti plodů při nedostatku vody se opět liší v závislosti na konkrétním kultivaru (Giné-Bordonaba & Terry 2016), což naznačuje potenciál pro šlechtění.

2.4. Mechanismy zvyšující odolnost k vybraným abiotickým stresům

Při nízkých teplotách a nedostatku vody dochází v rostlinách k vývojovým, fyziologickým a biochemickým změnám (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2000). Velká část z nich je způsobena změnami v expresi genů, zejména pak indukci genů stresové odpovědi. Ty lze obecně rozdělit na dvě hlavní skupiny (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2006):

- 1) Regulační proteiny - zahrnuté v přenosu signálů a dalších změnách genové exprese. Například proteinkinasy, proteinfosfatasy, fosfolipasy, transkripční faktory, ale i enzymy biosyntézy fytohormonů.
- 2) Funkční proteiny - přímo chránící buněčné struktury a zvyšující odolnost buněk ke stresu. Například chaperony, late embryogenesis abundant (LEA) proteiny, mRNA-vazebné proteiny, osmotin, antifreeze proteiny, klíčové enzymy pro biosyntézu osmolytů, aquaporiny, transportéry sacharidů či aminokyselin a detoxifikační enzymy.

Prokazatelné změny v expresi některých genů, ať už na úrovni transkriptomu nebo proteomu, byly v reakci na chlad pozorovány i u jahodníků. K nejčastěji pozorovaným a nejvýraznějším změnám patří zvýšení exprese genů pro dehydriny. Ty tvoří jednu ze skupin LEA proteinů (Bies-Ethève et al. 2008) a mají podobné hydrofilní vlastnosti jako kompatibilní soluty (Koehler et al. 2015). Pravděpodobně se uplatňují ve stabilizaci membrán (Ruelland et al. 2009), dále chrání strukturu enzymů, zabraňují jejich poškození při zmrznutí a udržují jejich funkčnost při nedostatku vody (Reyes et al. 2008). Některé také mohou vázat ionty (Alsheikh et al. 2003) nebo fungovat jako přímé zhášecí hydroxylových a peroxylových radikálů (Hara et al. 2004). U *Fragaria × ananassa* cv. 'Jonsok' bylo při vystavení teplotě 2 °C pozorováno zvýšení hladiny transkriptu pro dehydriny (Koehler et al. 2012). Transkript pro kyselý dehydrin (COR47-like) byl již po prvním dni 18 násobně zvýšen, pak ale jeho

množství začalo opět klesat. Naproti tomu množství transkriptu pro bazické dehydriny (XERO2-like) se zvyšovalo po celou dobu působení snížené teploty (6 týdnů) a na konci dosahovalo 2500 násobku oproti kontrole. K podobným změnám docházelo i u méně tolerantního kultivaru 'Frida', kde ale množství transkriptu bylo pro obě skupiny dehydrinů násobně nižší. Zvýšení tvorby proteinu COR47 při vystavení 2 °C bylo později pozorováno i u kultivaru 'Korona', a to na úrovni transkriptu i samotného proteinu (Koehler et al. 2015). U divoce rostoucích jahodníků pak byla nalezena korelace mezi obsahem dehydrinů a mrazuvzdorností daného druhu/ekotypu (Davik et al. 2013). Experimentálně bylo navíc prokázáno, že umělé navýšení akumulace kyselého dehydrinu, způsobené vnesením genu *Wcor410* z pšenice do *Fragaria* × *ananassa* cv. 'Chambly', zvýšilo jeho mrazuvzdornost o 5 °C (Houde et al. 2004). Toto zvýšení odolnosti se ale projevilo pouze při předchozí aklimaci rostlin, což naznačuje, že protein WCOR410 (a možná i některé další dehydriny) vyžadují aktivaci dalším faktorem indukovaným chladovou aklimací.

Dalšími proteiny, u kterých docházelo vlivem snížené teploty ke zvýšení jejich produkce, byly například malá podjednotka RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa) (Rivarola et al. 2011), dále RuBisCOaktivasa nebo peptidasy odstraňující poškozené D1 proteiny z reakčního centra fotosystému II (Koehler et al. 2015). Naopak ke snížení produkce docházelo u podjednotek PSI, PSII (fotosystémy I a II) a LHC (light harvesting complex) (Koehler et al. 2015). Tyto výsledky mohou naznačovat snahu rostlin o vyrovnání výkonu světelné a temnostní fáze fotosyntézy. Kvůli zpomalení metabolismu nízkou teplotou může být omezeno odčerpávání energie ze světelné fáze a docházet k následnému zvýšení oxidativního stresu.

U divoce rostoucích druhů i kulturních jahodníků bylo zjištěno chladem indukované zvýšení obsahu alkoholdehydrogenasy (ADH), která zabraňuje akumulaci toxických produktů anaerobního metabolismu (Davik et al. 2013). Množství ADH po 6 týdnech aklimace při 2 °C velmi dobře korelovalo s chladovou tolerancí druhu/ekotypu a u nejodolnějších dosahovalo až 200 násobku hodnot kontroly. U kultivarů *Fragaria* × *ananassa* byla také nalezena korelace mezi chladovou tolerancí a vyšší konstitutivní expresí HSPs (heat shock proteins), enolasy (klíčový enzym glykolytické dráhy) nebo proteinů zahrnutých v detoxifikaci ROS (reactive oxygen species/reaktivní formy kyslíku) (Koehler et al. 2012).

2.4.1. Akumulace sacharidů

Změny v expresi genů spolu se změnami aktivit enzymů, které jsou indukovány při chladové aklimaci mohou mít za následek rekonfiguraci metabolomu. Většina

metabolomických studií, zabývajících se teplotním stresem se shoduje na tom, že hlavní roli v této rekonfiguraci hraje centrální sacharidový metabolismus (Guy et al. 2008). Snížené teploty u rostlin indukují zvýšení exprese i posttranslační aktivaci enzymů syntézy sacharosy i dalších sacharidy metabolizujících enzymů (Koehler et al. 2015; Stitt & Hurry 2002; Livingston & Henson 1998). Následkem toho může docházet ke zvýšení obsahu sacharosy i dalších rozpustných sacharidů, a to v symplastu i apoplastu rostlin (Turhan 2012; Schulze et al. 2011; Kaplan et al. 2007; Cook et al. 2004; Livingston & Henson 1998). Tyto sacharidy pak tvoří základní skupinu osmolytů (Koehler et al. 2015), které snižují vodní potenciál a také teplotu tuhnutí vody (Turhan 2012). Dále také fungují jako osmoprotektanty, jejichž role spočívá ve stabilizaci membrán, proteinů a nukleových kyselin při snížení teplot a dehydrataci (Kurz 2008; Timasheff 2002; Strauss et al. 1986). Vzhledem k těmto vlastnostem není překvapivé, že například u rostlin *Arabidopsis thaliana* akumulace sacharidů dobře koreluje s chladovou tolerancí (Hannah et al. 2006). Obecně lze říci, že obsah rozpustných sacharidů v rostlinách se při vystavení nízkým teplotám zvyšuje (Koehler et al. 2015).

U rostlin jahodníku byly změny v celkovém obsahu rozpustných sacharidů již také pozorovány (Turhan 2012). Nicméně prací zabývajících se tímto tématem není mnoho a podrobná analýza změn obsahů jednotlivých složek sacharidového spektra při chladové aklimaci byla provedena pouze ve třech studiích (Koehler et al. 2015; Davik et al. 2013; Rohloff et al. 2012). Níže jsou popsány konkrétní případy těchto změn u vybraných skupin sacharidů:

- 1) **Hexosy:** U *F. vesca* i *F. × ananassa* bylo po 3 a 10 dnech aklimace při 2 °C pozorováno mírné zvýšení sorbosy a více než 2,5 násobné zvýšení obsahu glukosy, fruktosy, galaktosy a manosy, spolu s jejich fosforylovanými formami glukosa-6-fosfátem (G6P), fruktosa-6-fosfátem (F6P), galaktosa-6-fosfátem (Gal6P) a manosa-6-fosfátem (Man6P) (Koehler et al. 2015; Rohloff et al. 2012). Po 10 dnech patřily tyto sacharidy mezi nejvíce navýšené složky sacharidového spektra v listech i kořenech rostlin. Autoři zde předpokládají, že nárůst hexosafosfátů, a následně glukosy a fruktosy, byl způsoben zejména štěpením škrobu (Rohloff et al. 2012) a také že zvýšení obsahu hexosafosfátů je spojeno s cílenou syntézou dalších sacharidů, sloužících jako osmolyty (Koehler et al. 2015).
- 2) **Sacharosa:** Akumulace sacharosy v průběhu chladové aklimace je poměrně běžná a je způsobena zvýšením exprese a aktivity sacharosafosfátsynthasy (SPS) (Sasaki et al. 2001; Guy et al. 1992), která mimo jiné způsobuje i akumulaci sacharosy v plodech

jahodníku (Hubbard et al. 1991). U *F. × ananassa* cv 'Korona' bylo po 3 a 10 dnech aklimace při 2 °C pozorováno více než 2,5 násobné zvýšení obsahu sacharosy v listech, ovšem v kořenech byl její obsah naopak snížen (Koehler et al. 2015). Ve stonku kultivarů 'Aromas' a 'Diamante' rostoucích v polních podmínkách pak bylo zjištěno průkazné zvýšení obsahu sacharosy u vzorků odebíraných v lednu oproti vzorkům odebíraným v červenci. Toto zvýšení bylo navíc výraznější u odolnějšího kultivaru 'Diamante' (Turhan 2012). Existují ovšem i odlišné výsledky. Například u rostlin *F. vesca* se během 10 dnů aklimace při 2 °C očekávané zvýšení obsahu sacharosy nepotvrdilo (Rohloff et al. 2012). A ve studii s dalšími divokými diploidními druhy byla sice pozorována mírná akumulace sacharosy během 4 týdnů aklimace při 2 °C, ale byla také nalezena negativní korelace mezi chladovou odolností druhu a zvýšením obsahu sacharosy v prvních dvou dnech. Nejodolnější genotypy tedy v počátečních fázích aklimace akumulovaly sacharosu nejméně (Davik et al. 2013).

- 3) **Rafinosa a galaktinol:** Rohloff et al. (2012) pozorovali v rostlinách *F. vesca* při aklimaci ve 2 °C výrazný nárůst obsahu obou těchto sacharidů. Rafinosa byla po dobu 10 dnů postupně akumulována v listech i kořenech. Její prekurzor galaktinol vykazoval v kořenech podobný nárůst, ale v listech jeho zvýšení dosahovalo maxima již třetí den a poté jeho obsah začal opět mírně klesat. Tyto změny byly jednou z nejvýraznějších odpovědí *F. vesca* na působení chladu. Autoři také poukazují na pravděpodobnou spojitost s výrazným nárůstem množství glukosy, fruktosy a galaktosy. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo i u *F. × ananassa* cv. 'Korona' ve stejných podmínkách. Již po 3 dnech byl obsah rafinosy v listech a kořenech zvýšen přibližně pětkrát a obsah galaktinolu více než desetkrát. Na základě těchto výsledků autoři navrhují potenciální využití těchto metabolitů jako markerů mrazové odolnosti u jahodníků (Koehler et al. 2015). Nicméně když byla sledována souvislost mezi mrazuvzdorností různých druhů divokých jahodníků a mírou akumulace rafinosy v průběhu 4 týdnů chladové aklimace (2 °C), nebyla nalezena žádná korelace. V případě galaktinolu pak existovala korelace mezi mrazuvzdorností a jeho obsahem v 1. a 28. dni aklimace. Tato korelace však byla negativní (stejně jako u sacharosy). Odolnější genotypy tedy akumulovaly méně galaktinolu (Davik et al. 2013).
- 4) **Ostatní sacharidy:** Mezi další sacharidy, u nichž byl v rostlinách jahodníku zaznamenán výraznější nárůst obsahu během chladové aklimace, patřily některé pentosy, konkrétně xylosa a lyxosa. U nich bylo zaznamenáno více než 2,5 násobné přechodné zvýšení

během 1. až 3. dne působení chladu. K mírnému zvýšení docházelo také u cukerných alkoholů manitolu a inositolu. Konstitutivně vyšší úroveň obsahu inositolu se navíc ukázala jako jeden z možných znaků odlišujících tolerantnější ekotypy *F. vesca* (Koehler et al. 2015; Rohloff et al. 2012).

2.4.2. Akumulace dalších metabolitů

Mezi poměrně běžné látky, využívané rostlinami jako osmolyty či osmoprotektanty, patří také aminokyseliny a polyaminy (Ruelland et al. 2009). U rostlin *F. × ananassa* cv. ‘Korona’ bylo při chladové aklimaci ve 2 °C zjištěno zvýšení obsahu prolinu, glutamátu, glutaminu, aspartátu, alaninu, histidinu, argininu, methioninu a putrescinu. Toto zvýšení bylo ovšem pozorováno pouze v listech, zatímco v kořenech zůstávaly obsahy bez větších změn nebo byly dokonce snižovány. Nezdá se tedy pravděpodobné, že by tyto metabolity byly určujícím faktorem chladové tolerance jahodníku (Koehler et al. 2015). Dalšími látkami, jejichž obsah byl zvyšován působením snížených teplot, tentokrát u kultivarů ‘Aromas’ a ‘Diamante’, byly karotenoidy. Navíc byla nalezena korelace mezi jejich množstvím v listech a mrazovou tolerancí kultivaru (Turhan et al. 2012). V neposlední řadě pak byl u rostlin *F. vesca* i *F. × ananassa* při chladové aklimaci zaznamenán nárůst obsahu askorbátu, a to zejména v kořenech (Koehler et al. 2015; Rohloff et al. 2012).

Výše uvedené výsledky potvrzují, že chladová aklimace je velmi komplexní proces způsobený velkým množstvím změn v metabolismu. To odpovídá představě, že chladová tolerance je u rostlin kvantitativně podmíněným znakem (Xue et al. 2015). Identifikaci hlavních mechanismů této tolerance znesnadňují také velké rozdíly mezi jednotlivými druhy, ekotypy či kultivary jahodníku (Davik et al. 2013; Rohloff et al. 2012). U mnoha sledovaných parametrů byly navíc výrazné rozdíly mezi kořeny a listy, a také mezi časnými a pozdními fázemi chladové reakce, což je nutné zohlednit při interpretaci výsledů (Rohloff et al. 2012). Obecně lze říci, že snížení teplot u jahodníků indukuje tvorbu osmolytů a dehydrinů, a také ovlivňuje antioxidační systémy, jejichž zhášecí kapacita se zdá být vyšší u divokých diploidních druhů (Koehler et al. 2015). Odolnost konkrétního genotypu je pravděpodobně ovlivněna také rychlostí spouštění stresové reakce (Rohloff et al. 2012).

Odpověď rostlin na sucho je komplexní a vyšší tolerance je podobně jako v případě chladu přisuzována kombinaci více různých faktorů (Razavi et al. 2011; Chaves et al. 2002). U jahodníku se navíc odpověď na sucho velmi liší mezi kultivary (Grant et al. 2010; Klamkowski & Treder 2008). To jsou zřejmě hlavní důvody, proč detailní porozumění fyziologické odpovědi na sucho u jahodníku stále chybí (Sun et al. 2015). Existuje několik

obecných charakteristik, které se zdají být pro určení míry tolerance klíčové. Jednou z nich je míra transpirace, k jejímuž snížení u jahodníků při nedostatku vody obecně dochází (Ghaderi & Siosemardeh 2011). Při porovnávání kultivarů *F. × ananassa* byla vyšší tolerance pozorována u těch, které měly menší listovou plochu a nižší úroveň transpirace (Grant et al. 2010). To bylo později potvrzeno i při srovnání kultivarů *F. × ananassa* s několika ekotypy její divoké příbuzné *F. chiloensis* (Grant et al. 2012). Zvláště severoamerické ekotypy, které jsou menší, mají tlustší listy a silnější kutikulu, spotřebovávaly méně vody než *F. × ananassa*, a to při nedostatku vody i dostatečné závlivce. Tyto ekotypy měly menší vodivost průduchů, jejich citlivější regulaci a díky tomu i výrazně nižší transpiraci. Výsledkem pak bylo udržování vyššího vodního potenciálu v listech. Nejodolnější ekotyp, nesoucí označení 'BSP14', měl při vodním deficitu, oproti optimálním podmínkám, navíc zvýšenou efektivitu využití vody a jako jediný nevykazoval snížení listové plochy ani celkové suché hmotnosti. Omezení transpirace, které zamezuje ztrátám vody, je ale u *F. chiloensis* částečně spojené s limitací přísunu CO₂. Jejich růst je tedy méně omezen suchem, ale za optimálních podmínek je výrazně nižší než u *F. × ananassa*. Tato konzervativní růstová strategie je pravděpodobně hlavním důvodem jejich odolnosti, nicméně u pěstovaných kultivarů by způsobovala nevídané snížení výnosů. Slibnějšími znaky, které by mohly být vneseny do komerčních kultivarů, jsou citlivější regulace průduchů nebo zvýšená efektivita využití vody. Další charakteristikou, u které se ukazuje souvislost s udržení výnosů ve stresových podmínkách, je sklizňový index (harvest index, HI), tedy poměr biomasy plodů k celkové biomase rostliny (Martínez-Ferri et al. 2016). Kultivary s vyšším HI mají v optimálních podmínkách často stejný výnos jako kultivary s nižším HI, ovšem s menší vegetativní biomasou, a tedy i menší listovou plochou. Díky tomu ztratí transpirací méně vody a dokážou udržet stejný výnos i při její nižší dostupnosti.

Co se týče konkrétních metabolických mechanismů zvyšující toleranci jahodníků k nedostupnosti vody, často je uváděno osmotické přizpůsobení (Sun et al. 2015; Sun et al. 2013; Ghaderi & Siosemardeh 2011; Grant et al. 2010). Úprava osmolarity buňky akumulací kompatibilních solutů je velmi častá adaptivní odpověď na sucho či zasolení u odolných rostlin (Hameed & Ashraf 2008; Hsiao et al. 1976).

Jak bylo již řečeno dříve, jednu ze základních skupin osmolytů tvoří rozpustné sacharidy (Koehler et al. 2015). Jejich akumulace v listech rostlin při stresu z nedostatku vody je běžným jevem (Quick et al. 1992), pozorovaným i u jahodníku. U *F. × ananassa* cv. 'Toyonoka' byl pozorován nárůst obsahu celkových rozpustných sacharidů úměrný délce

působení sucha (Sun et al. 2013). Po 10 dnech obsahovaly listy rostlin bez závlivky až 2,5 násobně více rozpustných sacharidů než rostliny kontrolní. Tyto výsledky byly později při pokusu se stejným kultivarem jahodníku potvrzeny (Sun et al. 2015), a navíc bylo zjištěno, že nárůst obsahu sacharidů byl úměrný nejen délce působení stresu, ale i jeho intenzitě. Při dlouhodobějším experimentu s kultivarem 'Elsanta', kdy byly rostliny ponechány bez závlivky po dobu 51 dní, bylo pozorováno průkazné zvýšení obsahu sacharosy až po 40. dni (Razavi et al. 2008). Možným vysvětlením této opožděné reakce jsou kultivační podmínky. Rostliny byly kultivovány ve skleníku při teplotách 14 – 18 °C, a je tedy pravděpodobné, že k vysychání substrátu docházelo velmi pomalu. Dokládá to i malý rozdíl vodních potenciálů mezi listy stresovaných a kontrolních rostlin, který nepřesáhl 0,5 MPa. Zdá se také, že míra osmotického přizpůsobení pomocí rozpustných sacharidů je silně závislá na kultivaru. Při pokusu s šestidenním působením sucha na 2 kultivary *F. × ananassa* ('Kurdiastan' a 'Selva'), bylo zvýšení obsahu celkových rozpustných sacharidů pozorováno pouze u kultivaru 'Kurdiastan', a navíc pouze při silnějším stresu (Ghaderi & Siosemardeh 2011). V průběhu 1 dne po znovu zavlažení rostlin pak obsah rozpustných sacharidů opět klesl. V další studii, tentokrát se třemi kultivary *F. × ananassa* ('253/29', '279/4' a '279/5') byl měřen obsah sacharidů v listech po 30 dnech omezeného zavlažování (Giné-Bordonaba & Terry 2016). Pouze u kultivaru '279/4' bylo zjištěno mírné zvýšení obsahu fruktosy, glukosy a sacharosy. U zbylých dvou kultivarů docházelo v obsahu těchto sacharidů spíše ke snížení. Poměrně výrazné rozdíly v obsahu sacharidů byly mezi kultivary pozorovány i při dostatečném zavlažení. Schopnost osmotického přizpůsobení pomocí rozpustných sacharidů byla již před delší dobou zjišťována i u divokých druhů *F. chiloensis* a *F. virginiana* (Zhang & Archbold 1993). U *F. chiloensis*, která je považována za odolnější druh, způsobil nedostatek vody 1,4 až 2,4 násobné zvýšení obsahu rozpustných sacharidů v listech. Hlavními sacharidy podílejícími se na tomto zvýšení byly glukosa a fruktosa, které byly zvýšené 1,7 až 2 krát, respektive 1,4 až 2 krát. U citlivějšího druhu *F. virginiana* k žádným podobným změnám v obsahu rozpustných sacharidů nedošlo.

Dalším metabolitem, který pravděpodobně plní funkci osmolytu či osmoprotektantu a hraje roli v reakci jahodníku na nedostatek vody, je prolin. Změny v obsahu této aminokyseliny při působení sucha se zdají být podobné jako u rozpustných sacharidů. I u prolinu byla nalezena korelace mezi jeho obsahem a intenzitou i dobou působení sucha (Sun et al. 2015; Sun et al. 2013). Maximální zvýšení obsahu, pozorované po 10 dnech nejsilnějšího stresu, pak dosahovalo 2,3 násobku hodnot kontroly. Opět se zdá, že akumulace

prolinu při nedostatku vody je závislá na konkrétním kultivaru jahodníku. Při sledování stresové odpovědi kultivarů 'Kurdiastan' a 'Selva' bylo zvýšení obsahu prolinu pozorováno pouze u prvního ze jmenovaných (Ghaderi & Siosemardeh 2011).

2.5. Kombinace stresů

V přirozených podmínkách bývají rostliny často vystaveny více stresům zároveň. V několika studiích provedených na různých rostlinách již bylo prokázáno, že odpověď rostlin na kombinaci stresů se může kvalitativně lišit od odpovědi na stresy působící jednotlivě (Rivarola et al. 2011; Rizhsky et al. 2004; Rizhsky et al. 2002; Chaves et al. 2002). Konkrétně u jahodníku byly pozorovány změny v transkriptomu při vystavení osmotickému stresu, zvýšené teplotě a jejich kombinaci (Rivarola et al. 2011). Bylo nalezeno mnoho sekvencí, které byly exprimovány při kombinaci stresů, ale nikoliv při působení jednotlivých stresů samostatně. Navzdory tomu faktu, většina prací zabývajících se stresovou odolností rostlin zkoumá pouze vliv jednotlivých stresů a ne jejich kombinace (Rasmussen et al. 2013). Snížené teploty a nedostatek vody jsou nejběžnějšími abiotickými stresy, se kterými se rostliny jahodníku setkávají. Je tedy pravděpodobné, že často působí ve vzájemné kombinaci. Nicméně vliv jejich současného působení na stresovou odpověď jahodníků nebyl dosud zkoumán. Je známo, že odpověď rostlin na chlad a nedostatek vody se do značné míry shodují a indukují podobné biochemické procesy (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2000), což je ostatně patrné i z předchozí kapitoly o mechanismech zvyšujících odolnost rostlin k abiotickým stresům. Je tedy otázkou, zda kombinace těchto stresů způsobí pouze kvantitativní nebo i kvalitativní změnu stresové reakce.

Už delší dobu je známo, že sucho může stejně jako chlad indukovat mrazovou toleranci (Lang et al. 1994). Nedávno bylo dokonce zjištěno, že vodní stres průkazně přispívá k indukci chladové aklimace u jahodníků, a to dokonce vyšší měrou než samotné snížení teploty (Rajashekar & Panda 2014). Klasická dvoutýdenní chladová aklimace při 1 – 3 °C a zálivce udržující stále stejnou vlhkost substrátu způsobila u rostlin *F. × ananassa* cv. 'Surecrop' pokles vodního potenciálu v listech a zároveň zvýšení mrazové odolnosti o přibližně 14 °C. Pokud bylo ale zamezeno snížení vodního potenciálu v listech kultivací ve 100% vzdušné vlhkosti, mrazová odolnost byla zvýšena jen o 5 °C. Naproti tomu kultivace při 22 °C bez zálivky způsobila už po 6 dnech zvýšení mrazové odolnosti o zhruba 8 °C. Nicméně při dalším působení sucha už k dalšímu zvyšování odolnosti nedocházelo. Z toho autoři usuzují, že oba faktory, omezení dostupnosti vody i snížení teploty, mají v tomto případě aditivní efekt.

Dalším spojovacím článkem zmiňovaných abiotických stresů je rodina transkripčních faktorů CBF/DREB (C-repeat binding factor/dehydration responsive element binding protein), které jsou u rostlin významně zapojeny v indukci odpovědi na chlad i sucho (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2000). Poprvé byly identifikovány u *Arabidopsis thaliana*, kde rodina zahrnuje 3 proteiny označované CBF1, CBF2 a CBF3 respektive DREB1B, DREB1A a DREB1C (Medina et al. 1999; Liu et al. 1998). Časem bylo zjištěno, že se tyto transkripční faktory vyskytují u velkého množství rostlin (Yang et al. 2005) včetně *F. × ananassa*, kde byl identifikován ortholog FaCBF1 (Owens et al. 2002). Autoři také u jahodníku potvrdili zvýšenou expresi genu pro tento protein v důsledku vystavení chladu a vytvořili mutantní rostlinu *F. × ananassa* cv. 'Honeoye' s konstitutivně zvýšenou expresí genu pro CBF1, u které byla pozorována prokazatelně vyšší mrazová tolerance. Exprese genů pro CBF proteiny podléhá poměrně složité upstream regulaci, zahrnující například další transkripční faktor ICE1 (inducer of CBF expression 1) (Chinnusamy et al. 2003) nebo signalizaci pomocí vápníku (Doherty et al. 2009). Podrobněji jsou tyto signální dráhy diskutovány v práci Thomashow (2010). Následkem akumulace CBF proteinů nastávají změny v expresi desítek genů (Fowler & Thomashow 2002) vedoucí k rekonfiguraci primárního i sekundárního metabolismu a zvýšení stresové tolerance (Rohloff et al. 2012).

3. Materiál a metody

3.1. Kultivační medium

3.1.1. Zásobní roztoky solí a vitamínů

Jako základní bylo používáno MS medium (Murashige & Skoog 1962), pro které bylo potřeba namíchat následující roztoky:

MS-A (makroprvky)	Složka	Množství v g/l zásobního roztoku	Konečná koncentrace látky v g/l hotového media
	NH ₄ NO ₃	33	1,65
	KNO ₃	38	1,9
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	8,8	0,331
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,4	0,37
	KH ₂ PO ₄	3,4	0,17

Všechny složky byly za stálého míchání postupně rozpuštěny v přibližně 0,4 l deionizované vody (dH₂O) a následně byl vzniklý roztok v odměrném válci doplněn na celkový objem 0,5 l. Vzhledem k náchylnosti roztoku ke kontaminaci byl poté přelit do skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem a sterilizován v autoklávu (Tuttnauer 2540EK-N, Chirana PS20A nebo Systec DX-23) po dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,144 MPa. Roztok byl uchováván v lednici při teplotě 4-6 °C.

MS-B (mikroprvky)	Složka	Množství v g/l zásobního roztoku	Konečná koncentrace látky v mg/l hotového media
	KI	0,166	0,83
	H ₃ BO ₃	1,24	6,2
	MnSO ₄ · H ₂ O	3,38	16,9
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,72	8,6
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,05	0,25
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,005	0,025
	CoCl ₂	0,0026	0,013

Způsob míchání i skladování byl stejný jako u MS-A, s tím rozdílem, že roztok MS-B nebyl sterilizován a byl uchováván v lahvi se zábrusovým uzávěrem.

MS-C
(Fe-cheláty)

Složka	Množství v g/l zásobního roztoku	Konečná koncentrace látky v mg/l hotového media
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5,56	27,8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	7,46	37,3

Obě složky byly rozpuštěny zvlášť, každá v cca 0,2 l dH₂O. Oba roztoky byly za občasného míchání zahřáty v mikrovlnné troubě (Eta 7199), aby došlo k úplnému rozpuštění, a poté byl roztok Na₂EDTA za stálého míchání přilít k roztoku FeSO₄. Výsledný roztok byl míchán až do vychladnutí, v odměrném válci doplněn dH₂O na celkový objem 0,5 l a uchováván v lahvi se zábrusovým uzávěrem v lednici při 4-6 °C.

MS-D
(vitamíny)

Složka	Množství v g/l zásobního roztoku	Konečná koncentrace látky v mg/l hotového media
Inositol	20	100
Kyselina nikotinová	0,1	0,5
Pyridoxin-HCl	0,1	0,5
Thiamin-HCl	0,1	0,5
Glycin	0,4	2

Všechny složky byly postupně rozpuštěny v přibližně 0,4 l dH₂O a vzniklý roztok byl v odměrném válci doplněn na celkový objem 0,5 l. Následně byl rozpipetován po 5 ml do plastových nádobek a uchováván v mrazáku při -20 °C.

3.1.2. Příprava media ze zásobních roztoků

Složka	Množství na 1 litr media
MS-A	50 ml
MS-B	5 ml
MS-C	5 ml
MS-D	5 ml
Sacharosa	30 g
Agar	8 g

Konkrétní objemy zásobních roztoků byly za stálého míchání přility do odměrky k menšímu množství dH₂O. Dále bylo přidáno příslušné množství sacharosy a po jejím rozpuštění byl roztok v odměrném válci doplněn dH₂O do konečného objemu. Za stálého míchání bylo pomocí 1M nebo 0,2M roztoku KOH a 1M nebo 0,2M roztoku HCl upraveno pH na požadovanou hodnotu 5,8 (pH metr Orion 410 A+). Následně bylo v roztoku rozmícháno příslušné množství agaru. Medium bylo za občasného míchání rozvařeno v mikrovlnné troubě a rozlito do Erlenmayerových baněk. Ty byly uzavřeny alobalem a sterilizovány v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,144 MPa.

3.1.3. Zásobní roztoky růstových regulátorů

Růstový regulátor:	Množství v g/25ml	rozpouštědlo
6-benzylaminopurin (BAP)	25	1M NaOH
kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D)	12,5	1M NaOH
Kyselina gibberelová (GA3)	25	96% ethanol
Kyselina naftyloctová (NAA)	25	1M NaOH
Thidiazuron (TDZ)	25	1M KOH

Zásobní roztoky růstových regulátorů byly připravovány v objemu 25 ml a koncentraci 1 mg/ml (kromě roztoku 2,4-D, který byl připravován v koncentraci 0,5 mg/ml). Příslušné množství růstového regulátoru bylo vždy naváženo do malé kádinky a za stálého míchání bylo přikapáváno rozpouštědlo, dokud se růstový regulátor zcela nerozpustil. Poté byl roztok v malém odměrném válci doplněn dH₂O na požadovaný objem 25 ml, a v plastové zkumavce se šroubovacím uzávěrem uchováván v lednici při teplotě 4-6 °C. Přidávání růstových regulátorů do media probíhalo po smíchání ostatních zásobních roztoků a před měřením pH.

3.2. Kultivace rostlinného materiálu

Jako pokusný materiál byly využívány rostliny a kalusové kultury jahodníku obecného (*Fragaria vesca* L.)

3.2.1. Výsev semen *in vitro*

Sterilizace: Semena byla nasypána do mikrozskumavky, byl k nim připipetován 1 ml 96% ethanolu a s ním byla semena ručně protřepána. Poté byl ethanol pipetou odsát, k semenům byl připipetován 1 ml 15% roztoku komerčního bělidla SAVO (odpovídá 0,7%

NaClO) a přidána kapka detergentu (Jar). Mikrozkumavka byla umístěna na 15 min na třepačku (IKA KS 130 control).

Výsev: Další práce již probíhala ve sterilních podmínkách laminárního flow-boxu (*Faster Schoeller instruments* nebo *Heraeus LaminAir® TL2448*). Z mikrozkumavky byl pipetou za použití sterilních špiček odsát roztok chlornanu s detergentem a semena byla 3× propláchnuta sterilní dH₂O. Semena po 5 až 6 kusech byla s kapkou vody pomocí pipety nasáta do ustřižené špičky a vstříknuta do baňky na povrch tuhého MS media. V případě potřeby byla ještě kovovou špachtličkou v baňce rovnoměrně rozmístěna. Baňka byla nakonec uzavřena víčkem z alobalu.

3.2.2. Udržovací kultivace rostlin

Udržovací kultury rostlin byly kultivovány ve 100ml Erlenmayerových baňkách na základním MS mediu v klimaboxu a kultivační místnosti (podmínky viz tabulka), vždy s 16 hodinovou fotoperiodou. Přibližně 2 měsíce po výsevu byly rostlinky rozsazeny do baněk po jedné. Následné pasážování probíhalo vzhledem k pomalému a nestejnomyšlnému růstu rostlin v intervalu 2 – 4 měsíců.

prostory	teplota	intenzita osvětlení [lx]	fotosynteticky aktivní záření [μmol fotonů/m ² /s]
klimabox	25±1 °C	500 (bez výbojky) 1100 (s výbojkou)	9 (bez výbojky) 23 (s výbojkou)
kultivační místnost	23±1 °C	3500	50

3.2.3. Vegetativní množení *in vitro*

- 1) Regenerace prýtů z listových segmentů pomocí thidiazuronu (1- fenyl-3- (1,2,3-thiadiazol-5-yl) močovina, TDZ) (Haddadi et al. 2003):

Z rostliny z udržovací kultury byly odebrány části listových čepelí a řapíků o velikosti přibližně 0,5 cm², respektive 1 cm. Ty byly přeneseny do baněk s na MS medium s přídavkem TDZ v koncentraci 0,881 mg/l (4 μM) a dále byly kultivovány v klimaboxu ve stejných podmínkách jako udržovací kultura.

- 2) Zmnožení prýtů rostliny, indukované 6-benzylaminopurinem (BAP) a kyselinou gibberelovou (GA3) (Sharma et al. 2012):

Rostliny z udržovací kultury byly přesazeny na MS medium s přidavkem kombinace růstových regulátorů BAP a GA3, každý v koncentraci 2 mg/l. Dále byly rostliny kultivovány v klimaboxu nebo kultivační místnosti, ve stejných podmínkách jako udržovací kultura.

3.2.4. Odvození a udržování kalusové kultury

Z rostliny *F. vesca* z udržovací kultury byly odebrány přibližně 1 cm dlouhé segmenty řapíků a byly přeneseny na dvě různá indukční media. Vždy po 4 kusech do jedné baňky.

- 1) MS medium s přidavkem kaseinu v koncentraci 1g/l, kyseliny naftyloctové (NAA) a kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové (2,4-D), obou v koncentraci 1 mg/l. (Suchomelová-Mašková et al. 2008)
- 2) MS medium s přidavkem 4 mg/l NAA a 2 mg/l BAP (Avilés et al. 2009).

Baňky s řapíkovými segmenty byly umístěny do klimaboxu. Část baněk byla ponechána na světle a kultivována při 16 hodinové fotoperiodě v podmínkách shodných s udržovací kulturou rostlin a část byla kultivována ve stálé tmě, což bylo zajištěno jejich přiklopením kartonovou krabicí. Po vytvoření kalusu byl pomocí pinzety a skalpelu odstraněn primární explantát a izolovaný kalus byl přenesen do nové baňky. Na udržovací kultivaci kalusové kultury bylo používáno druhé z výše uvedených indukčních medií s drobnou modifikací, a to zvýšením obsahu BAP z 2 mg/l na 2,5 mg/l. Jednotlivé části kalusové kultury byly kultivovány v 50ml Erlenmayerových baňkách po 1 až 3 kusech (podle velikosti). Baňky byly opět umístěny v klimaboxu, tentokrát všechny ve tmě pod kartonovou krabicí. Pasážování kalusových kultur probíhalo v intervalu 3 – 4 týdnů a vysazováno bylo inokulum přibližně o velikosti 0,5 – 1 cm³.

Veškeré pasážování kultur i odebírání částí rostlin pro účely vegetativního množení či indukce kalusu bylo vždy prováděno ve sterilních podmínkách laminárního flow-boxu.

3.2.5. Sterilizace nástrojů a materiálu

Pipetovací špičky v uzavřené krabičce a dH₂O v Erlenmayerových baňkách s alobalovým víčkem byly sterilizovány v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,144 MPa. Petriho misky zabalené v alobalu a kovové nástroje (špachtličky, pinzety, skalpely) uzavřené alobalem ve skleněném tubusu byly sterilizovány v horkovzdušném

sterilizátoru BINDER 3 hodiny při teplotě 150 °C. Kovové nástroje byly navíc při práci ve flow-boxu průběžně sterilizovány namočením do 96% ethanolu a opálením.

3.3. Experimentální ošetření

Při přesazování byly rostlinám vždy zakráčeny kořeny na 2 – 3 cm a odstraněny staré listy tak, aby zbylo pouze 5 – 6 nejmladších listů růžice. Při potřebě vážení rostlin nebo kalusů na začátku experimentu byla vždy nejdříve zvážena samotná baňka s médiem a po přesazení byla zvážena i s kulturou. Po odečtení hodnot tak byla získána počáteční hmotnost rostlin či kalusů.

Ošetření sníženou teplotou bylo zajišťováno přemístěním rostlin či kalusových kultur do lednice s teplotou 10 – 12 °C. Vzhledem k absenci osvětlení v lednici bylo nutné umisťovat sem rostliny pouze na osmihodinovou periodu noční tmy a poté je vracet do původních podmínek, aby nedošlo k ovlivnění výsledků pokusu změněným světelným režimem. Kalusové kultury, které byly kultivovány permanentně ve tmě, mohly být umisťovány do lednice i během dne. Ovšem osmihodinová perioda působení chladu byla vždy zachována.

3.3.1. Úpravy medií pro experimenty

- Přidání chloridu sodného (NaCl) v konečné koncentraci v médiu 100 mM (5,844 g/l). NaCl byl do media přidáván po smíchání zásobních roztoků a před doplněním objemu a měřením pH.
- Přidání polyethylenglykolu (PEG) 4000 v množství 6 % (60 g/l). Ten byl do media přidáván až po měření pH, aby nezanášel elektrodu pH metru.
- Přidání validamycinu A v konečné koncentraci v médiu 150 µM (18,66 mg/l). Nejdříve byl vytvořen sterilní zásobní roztok, a to rozpuštěním 50 mg validamycinu A v 5 ml dH₂O a následným přefiltrováním do sterilní plastové nádoby pomocí injekční stříkačky se sterilním šroubovacím filtrem (Rotilabo syringe filter, velikost pórů 0,45 µm). Do částečně zchladlého media, předem vysterilizovaného ve skleněné lahvi bylo poté ve flow-boxu přidáno příslušné množství zásobního roztoku. Medium bylo v lahvi promícháno a rozlito do sterilních Erlenmayerových baněk.
- Zvýšení obsahu sacharosy na 60 g/l.
- Nahrazení sacharosy sorbitolem (ve stejném množství 30 g/l).
- Snížení obsahu sacharosy na 15 g/l a přidání sorbitolu v množství 15 g/l.

3.3.2. Výroba a použití uzávěrů kultivačních nádob sun cap

Nejdříve byl nastříhán autoklávovatelný polypropylenový pytel na čtverce o straně cca 15 cm. Uprostřed čtverců byly korkovrtem vyříznuty dva kruhové otvory o průměru 10 mm. Přes ně byly následně přelepeny samolepící kruhové filtry o průměru 18 mm s velikostí pórů 0,04 μm (Sun cap closures, Sigma-Aldrich). Takto připravené uzávěry byly proloženy mokrým filtračním papírem, aby nedošlo k jejich slepení, uzavřeny do Petriho misky a sterilizovány v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,144 MPa. Následně mohly být ve flow-boxu těmito uzávěry nahrazeny původní alobalové. Dostatečně těsné uzavření Erlenmayerových baněk pomocí sun cap uzávěrů bylo zajištěno přichycením gumičkou k hrdlu baňky.

3.4. Přehled uspořádání experimentů

Dále je formou tabulek znázorněno uspořádání jednotlivých experimentů. Podmínky kultivace (teplota, osvětlení, fotoperioda) v klimaboxu a kultivační místnosti byly vždy shodné s výše uvedenými podmínkami kultivace udržovacích kultur:

3.4.1. Experimenty s rostlinami

Experiment 1:

Varianta:	Medium:	Počet rostlin	Doba a kultivace a podmínky:
Kontrola	MS	10	30 dní- klimabox
NaCl	MS + 100mM NaCl	10	30 dní- klimabox
PEG	MS + 6 % PEG	10	30 dní- klimabox

Experiment 2:

Varianta:	Medium:	Počet rostlin:	Doba a kultivace a podmínky:	
Kontrola	MS	7	10 dní - klimabox	
Chlad		7	7 dní - klimabox	+ 3 dny noční chlad
NaCl	MS + 100mM NaCl	7	10 dní - klimabox	
NaCl+chlad		7	7 dní - klimabox	+ 3 dny noční chlad
PEG	MS + 6 % PEG	7	10 dní - standardní podmínky	
PEG+chlad		7	7 dní - klimabox	+ 3 dny noční chlad

Experiment 3:

Varianta:	Medium:	Počet rostlin:	Doba kultivace a podmínky:
Kontrola	MS	6	3 dny – kultivační místnost
		6	10 dní – kultivační místnost
		6	30 dní – kultivační místnost
PEG	MS + 6% PEG	6	3 dny – kultivační místnost
		6	10 dní – kultivační místnost
		6	30 dní – kultivační místnost

Experiment 4:

Varianta:	Medium:	Počet rostlin:	Doba kultivace a podmínky:
kontrola	MS	7	3 dny – kultivační místnost
		7	7 dní – kultivační místnost
		7	10 dní – kultivační místnost
		7	12 dní – kultivační místnost
		7	30 dní – kultivační místnost
chlad	MS	7	7 dní – kultivační místnost +3 dny noční chlad
		7	7 dní – kultivační místnost +5 dní noční chlad
PEG	MS + 6 % PEG	7	3 dny – kultivační místnost
		7	7 dní – kultivační místnost
		7	10 dní – kultivační místnost
		7	12 dní – kultivační místnost
		7	30 dní – kultivační místnost
PEG +chlad	MS + 6 % PEG	7	7 dní – kultivační místnost +3 dny noční chlad
		7	7 dní – kultivační místnost +5 dní noční chlad

Experiment 5:

Varianta:	Medium:	Počet rostlin:	Doba kultivace a podmínky:
kontrola	MS	15	10 dní – kultivační místnost
PEG	MS + 6 % PEG	15	10 dní – kultivační místnost

Experiment 6:

Varianta:	Medium:	Počet rostlin:	Doba kultivace a podmínky:
kontrola	MS	7	10 dní – kultivační místnost
Val.	MS + 150 μ M Validamycin A	7	10 dní – kultivační místnost
PEG	MS + 6 % PEG	7	10 dní – kultivační místnost
PEG+Val	MS + 6 % PEG + 150 μ M Validamycin A	7	10 dní – kultivační místnost

Experiment 7:

Varianta:	Medium:	Počet rostlin:	Doba kultivace a podmínky:
Kontrola	MS	6	10 dní – kultivační místnost
		6	30 dní – kultivační místnost
Sun cap	MS-0	6	10 dní – kultivační místnost, uzávěr sun cap
		6	30 dní – kultivační místnost, uzávěr sun cap

3.4.2. Experimenty s kalusy

Experiment 8:

Varianta:	Medium:	Počet kalusů:	Doba kultivace a podmínky:
Kontrola	MS (+ 3 % sacharosy)	7	14 dní – klimabox, tma
Sacharosa 6	MS + 6 % sacharosy	7	14 dní – klimabox, tma
Sorbitol	MS bez sacharosy + 3 % sorbitolu	7	14 dní – klimabox, tma
Sach/Sorb.	MS + 1,5 % sacharosy +1,5 % sorbitolu	7	14 dní – klimabox, tma

Experiment 9:

Varianta:	Medium:	Počet kalusů:	Doba kultivace a podmínky:	
Kontrola	MS	8	3 dny – klimabox, tma	
		8	10 dní – klimabox, tma	
		8	21 dní – klimabox, tma	
		8	30 dní – klimabox, tma	
PEG	MS + 6 % PEG	8	3 dny – klimabox, tma	
		8	10 dní – klimabox, tma	
		8	21 dní – klimabox, tma	
		8	30 dní – klimabox, tma	

Experiment 10:

Varianta:	Medium:	Počet kalusů:	Doba kultivace a podmínky:	
Kontrola	MS	8	10 dní – klimabox, tma	
Chlad		8	7 dní - klimabox, tma	+ 3 dny denní chlad
NaCl	MS + 100mM	8	10 dní - klimabox, tma	
NaCl+chlad	NaCl	8	7 dní - klimabox, tma	+ 3 dny denní chlad
PEG	MS + 6% PEG	8	10 dní - klimabox, tma	
PEG+chlad		8	7 dní - klimabox, tma	+ 3 dny denní chlad

Experiment 11:

Varianta:	Medium:	Počet kalusů:	Doba kultivace a podmínky:
kontrola	MS	8	10 dní – klimabox, tma
Val.	MS + 150 μ M Validamycin A	8	10 dní – klimabox, tma
PEG	MS + 6 % PEG	8	10 dní – klimabox, tma
PEG+Val	MS + 6 % PEG + 150 μ M Validamycin A	8	10 dní – klimabox, tma

3.5. Odběr materiálu

3.5.1. Fotografování

Vybrané kultury byly v baňkách těsně před odebráním vzorků vyfotografovány. Fotografování probíhalo na černém podkladu, fotoaparátem Panasonic Lumix DMC-GF2 s objektivem Panasonic Lumix G Vario 14-42 mm F3.5-5.6 II ASPH.

3.5.2. Odběr rostlin

V případě potřeby vážení celých rostlin, byla rostlina pinzetou vytažena z baňky, v dH₂O jí byly omyty kořeny od zbytků media, následně byla osušena na filtračním papíru a zvážena. Z každé rostliny byly odebrány 2 vzorky listových čepelí. První na analýzu sacharidů o hmotnosti 10 – 100 mg, a druhý na měření obsahu MDA o hmotnosti 20 – 100 mg. Vzorky byly ihned po zvážení uzavřeny do popsané plastové mikrokumavky s předem proděravěným víčkem a zmrazeny v tekutém dusíku. Až do dalšího zpracování byly uchovávány při teplotě -80 °C.

3.5.3. Odběr kalusů

Kalus byl vždy opatrně sejmut pinzetou z povrchu media, tak aby na něm žádné medium nezůstalo. Byl zvážen a následně z něj byly odebrány 2 vzorky. Vzhledem k tomu, že kalusy měly větší hmotnost než listové čepele, mohly být odebírány větší vzorky na analýzu sacharidů, a to v rozmezí 50-200 mg. Na měření obsahu MDA bylo opět odebíráno 20-100 mg. Další postup byl shodný se vzorky z rostlin.

3.6. Stanovení růstových charakteristik

Přírůstek čerstvé hmotnosti (FW) v průběhu experimentu byl vyjadřován ve formě růstového koeficientu vypočítaného podle vzorce:

$$\Delta m(\text{FW}) = (m_t - m_0) / m_0 \text{ [g]}$$

Kde: **m₀** je počáteční hmotnost kultury zjištěná na začátku experimentu

m_t je konečná hmotnost v čase **t**, zjištěná při odběru vzorků

Obsah vody (WC) v kulturách na konci experimentu byl vypočítán podle vzorce:

$$\text{WC} = (\text{FW} - \text{DW}) / \text{FW}$$

Kde: **FW** je čerstvá hmotnost vzorku odebraného na analýzu sacharidů

DW je suchá hmotnost stejného vzorku, zjištěná jeho zvážením po lyofilizaci

Ze zjištěných hodnot $\Delta m(\text{FW})$ a WC byl vždy u každé experimentální varianty a konkrétního odběru vypočítán aritmetický průměr podle vzorce:

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n) / n$$

3.7. Analýza obsahu nestrukturních sacharidů

3.7.1. Příprava vzorků pro analýzu nestrukturních sacharidů

Zmrazené vzorky byly vloženy do lyofilizátoru (Lyovac GT 2, Finn-Aqua) spolu s malým množstvím tekutého dusíku a lyofilizovány cca 20 hodin. Na analytických laboratorních vahách byla zjištěna suchá hmotnost jednotlivých vzorků, následně bylo ke každému připipetováno 0,5 ml 80 % methanolu a vzorek byl inkubován v termobločku (Grant-Boeckel BBD) při teplotě 75 °C po dobu 15 minut. Methanol byl následně odpařen pomocí vakuového koncentrátoru SpeedVac Plus SC110A, Savant (3 hodiny při programu V-AL a 45 °C). Podle suché hmotnosti vzorků bylo ke každému přidáno odpovídající množství ultračisté MiliQ H₂O (tabulka 1). Vzorky byly na 15 minut umístěny do ultrazvukové lázně (Julabo USR 05) a následně centrifugovány (pomocí centrifugy Eppendorf Centrifuge 5415 D) 10 minut při 14 000×g. Supernatant byl přefiltrován pomocí injekční stříkačky přes membránové filtry (Millex Milipore, velikost pórů 0,22 μm) do nové popsané mikrozkuřavky. Pro všechny vzorky v jedné sérii byla používána stejná injekční stříkačka s jehlou a mezi jednotlivými vzorky byla 3× propláchnuta MiliQ H₂O. Filtr byl používán nový pro každý vzorek. Přefiltrovaný supernatant byl až do analýzy uchováván v mrazáku při -20 °C.

Suchá hmotnost vzorku [mg]	MiliQ H ₂ O [ml]
< 5	0,2
5 – 10	0,3
10 – 20	0,5
20 – 30	1
30 – 40	1,5
40 – 50	2

Tabulka 1: Vztah množství MiliQ H₂O k suché hmotnosti vzorku.

3.7.2. Stanovení obsahu a spektra nestrukturních sacharidů

Analýza sacharidů probíhala pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC) s refraktometrickou detekcí s následujícími parametry:

Teplota kolony 80 °C; průtoková rychlost 0,5 ml/min; mobilní fáze - MiliQ H₂O; objem injikovaného vzorku 10 µl nebo 20 µl podle velikosti nástřikové smyčky; předkolonka Shodex Pb2+ (SP-G); kolona Shodex Pb2+ (SP0810); isokratická pumpa SISw HPI-300 nebo Delta Chrom SDS 030; refraktometrická detekce (detektor Shodex RI-71); software CLARITY; endogenní sacharidy byly identifikovány na základě srovnání retenčních časů s příslušnými standardy (Sigma-Aldrich).

Výpočet množství jednotlivých sacharidů probíhal podle vzorce:

$$\text{Množství sacharidu v sušině} = S_x / S_s * V_{H_2O} / DW [\mu\text{g}/\text{mg}]$$

Kde: **S_x** je plocha peaku konkrétního sacharidu v chromatogramu konkrétního vzorku

S_s je plocha peaku standardu příslušného sacharidu

V_{H₂O} je objem MiliQ H₂O, která byla ke vzorku přidána

DW je suchá hmotnost vzorku

3.8. Analýza obsahu malondialdehydu (MDA)

3.8.1. Příprava vzorků pro měření obsahu MDA

Pro měření bylo nejdříve potřeba namíchat následující roztoky:

- Zásobní roztok 1% butylovaného hydroxytoluenu (BHT): Na 1 ml roztoku bylo rozpuštěno 0,01 g BHT v 990 µl 80% ethanolu.
- 80% ethanol s BHT: Do 100 ml 80% ethanolu bylo přidáno 10 µl zásobního roztoku BHT (výsledná koncentrace BHT v roztoku byla 1 ppm)
- (TBA-): Na 100 ml roztoku bylo v 80 ml dH₂O za stálého míchání rozpuštěno 20 g kyseliny trichloroctové (TCA) a 0,01 g BHT
- (TBA+): Na 100 ml roztoku bylo v 79,35 ml dH₂O za stálého míchání rozpuštěno 20 g TCA, 0,01 g BHT a 0,65 g kyseliny thiobarbiturové (TBA). Vzhledem ke špatné rozpustnosti TBA byl roztok při míchání zahříván, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění.

Roztoky byly skladovány v plastových nádobkách v lednici.

Vzorky pro měření obsahu MDA byly vyjmuty z mrazáku a umístěny do termosky s tekutým dusíkem. Jednotlivé vzorky byly odebírány z dusíku a každý byl důkladně

homogenizován ve 2 ml roztoku 80% ethanolu s BHT ve vychlazené třecí misce. Poté byl vzorek slit do nové plastové mikrozkuhavky a umístěn do ledu, aby nedošlo k jeho zahřátí. Před homogenizací dalšího vzorku byla třecí miska s tloučkem vždy důkladně vymyta, vysušena a v případě potřeby znovu vychlazená tekutým dusíkem. Homogenizované vzorky byly 20 minut centrifugovány při 4 °C a RCF 9000g (centrifuga Hettich universal 32 R). Supernatant byl následně rozdělen do 2 nových mikrozkuhavek (0,7 ml do každé). Do jedné z nich bylo přidáno 0,7 ml roztoku (TBA-) a do druhé 0,7 ml roztoku (TBA+). Tyto směsi byly 25 minut temperovány v termobločku při 95 °C, s otevřenými víčky mikrozkuhavek. Poté byly vzorky zchlazeny v ledu a znovu centrifugovány 20 minut při 4 °C a RCF 9000g. Po centrifugaci byly vzorky opět umístěny do ledu.

3.8.2. Stanovení obsahu MDA

Supernatant z připravených vzorků byl přepipetován do plastových kyvet a na spektrofotometru byla změřena jeho absorbance při vlnových délkách 440 nm, 532 nm a 600 nm. Jako blank pro měření byla použita dH₂O. Ze získaných hodnot byla vypočítána koncentrace MDA podle následujících rovnic:

$$C_{MDA} = 10^6 * [(A - B) / 157\ 000] * 0,08 / m \text{ [nmol/ml]}$$

$$A = [(A_{532} +TBA - A_{600} +TBA) - (A_{532} -TBA - A_{600} -TBA)]$$

$$B = [(A_{440} +TBA - A_{600} +TBA) * 0,0571]$$

Kde $A_{440} +TBA$ = absorbance vzorku s roztokem (TBA+) při vlnové délce 440 nm

$A_{532} +TBA$ = absorbance vzorku s roztokem (TBA+) při vlnové délce 532 nm

$A_{600} +TBA$ = absorbance vzorku s roztokem (TBA+) při vlnové délce 600 nm

$A_{532} -TBA$ = absorbance vzorku s roztokem (TBA-) při vlnové délce 532 nm

$A_{600} -TBA$ = absorbance vzorku s roztokem (TBA-) při vlnové délce 600 nm

157 000 = $\epsilon(MDA)_{532}$ = molární absorpční koeficient pro MDA při vlnové délce 532 nm

(Albro et al. 1986)

0,0571 = $\epsilon(sach)_{532} / \epsilon(sach)_{440}$ = poměr molárních absorpčních koeficientů sacharosy při vlnové délce 532 nm a 440 nm (Hodges et al. 1999)

0,08 g = hmotnost, kterou by vzorky měli mít při objemu rozpouštědla

2 ml a poměru hmotnosti vzorku k rozpouštědлу 1:25

m = hmotnost vzorku

V původní metodice (Hodges et al. 1999) je u všech vzorků poměr hmotnosti odebraného materiálu k rozpouštědлу 1 : 25 (při objemu rozpouštědla 2 ml, by tedy všechny vzorky měly vážit 0,08 g). Vzhledem k tomu, že odvažování stejných hmotností všech vzorků by způsobovalo zbytečné prodlevy mezi odebráním a zmražením vzorku a odměřovat objem rozpouštědla ke každému vzorku zvlášť, by bylo velmi časově náročné, tento poměr nebyl vždy zachován. Problém byl vyřešen výpočetní korekcí, a to vynásobením výsledku číslem 0,08 a vydělením reálnou hmotností každého vzorku. Výsledná hodnota C_{MDA} vychází v jednotkách nmol MDA na ml rozpouštědla.

3.9. Zpracování dat

Základní výpočty a grafické zpracování dat probíhalo v programu Microsoft Office Excel 2013. Úprava chromatogramů probíhala v programu CLARITY. Statistické vyhodnocení probíhalo v programu NCSS97. Pro porovnávání dat byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (one-way ANOVA). V případě normálního rozdělení dat byl jako mnohonásobný srovnávací test použit Tukey-Kramer test. V případě nenormálního rozdělení byl použit Kruskal-Wallis Z test. Hladina významnosti byla zvolena u všech testů $\alpha = 0,05$.

4. Výsledky

4.1. Optimalizace podmínek kultivace rostlin *Fragaria vesca in vitro*

Zvolený postup sterilizace a výsevu semen i použité kultivační medium (viz kapitola 2.2.1. a 2.1.) se ukázaly jako vhodné pro kultivaci rostlin *Fragaria vesca*. Většina semen začala po 2 až 3 týdnech klíčit a ke kontaminacím docházelo pouze zřídka. Růst jahodníků v podmínkách *in vitro* je poměrně pomalý a nerovnoměrný. Některé rostliny dosáhly velikosti vhodné pro přesazení z výsevu již po zhruba 4 týdnech, zatímco jiným nárůst do stejné velikosti trval i dvojnásobně dlouho. Optimální velikosti pro experimenty pak bylo dosaženo



Obrázek 1: Rostliny z udržovací kultury pěstované v klimaboxu.



Obrázek 2: Rostliny z udržovací kultury pěstované v kultivační místnosti.

po 5 až 6 měsících. Výrazný vliv na rychlost růstu, a zvláště pak na výsledný fenotyp rostlin, měly kultivační podmínky. Rostliny pěstované v klimaboxu (podmínky viz kapitola 2.2.2. Udržovací kultivace rostlin) byly slabé a měly velmi malé, sytě zelené listy (obr. 1). Naproti tomu rostliny pěstované v kultivační místnosti, kde byla o 2 °C nižší teplota a výrazně vyšší ozáření (viz kapitola 2.2.2.) byly celkově mohutnější a měly výrazně větší a světleji zelené listy (obr. 2). Častěji u nich však docházelo k hnědnutí a odumírání

listů. První dva experimenty s rostlinami byly prováděny v klimaboxu a další již v kultivační místnosti.

4.2. Vegetativní množení rostlin

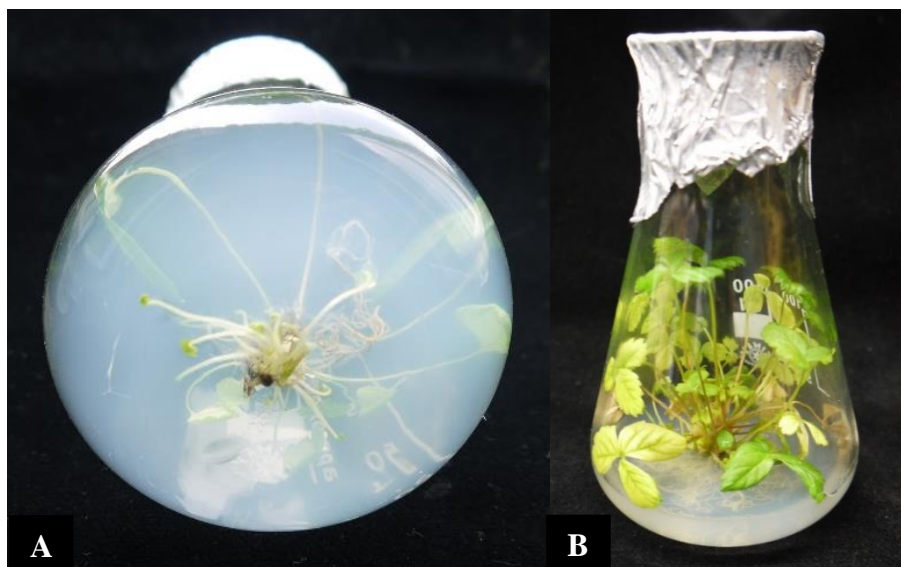
Z důvodů pomalého a nerovnoměrného růstu jahodníků ze semen by bylo velmi časově náročné dopěstovat z výsevů dostatek rostlinného materiálu na experimenty. Bylo tedy přikročeno k vegetativnímu množení, umožňujícímu získat potřebný počet rostlin v kratším čase. Další nespornou výhodou takto množného materiálu je jeho vyšší uniformita zajišťující přesnější výsledky.

4.2.1. Indukce regenerace prýtů z listových segmentů pomocí thidiazuronu

MS medium s přidavkem TDZ v koncentraci 0,881 mg/l (4 μ M) se pro vegetativní množení jahodníků příliš neosvědčilo. V případě použití segmentů řapíku jako primárních explantátů, došlo u části z nich po několika měsících k odumření a u zbytku pouze k vytvoření malého, tuhého a zeleného kalusu. U segmentů listových čepelí došlo k vytvoření podobného kalusu u většiny z nich, a po zhruba 5 měsících kultivace se na některých začaly objevovat i základy prýtů. Vzhledem k časové náročnosti a nízké úspěšnosti ale tato metoda nebyla nadále používána.

4.2.2. Zmnožení prýtů rostliny indukované pomocí 6-benzylaminopurinu a kyseliny giberelové

U rostlin kultivovaných na MS mediu s uvedenými růstovými regulátory (oba současně,



Obrázek 3: Indukce tvorby adventivních prýtů *F. vesca* aplikací růstových regulátorů BAP a GA3. A – vytvoření základů prýtů po 2 týdnech kultivace; B – trs prýtů vzniklý

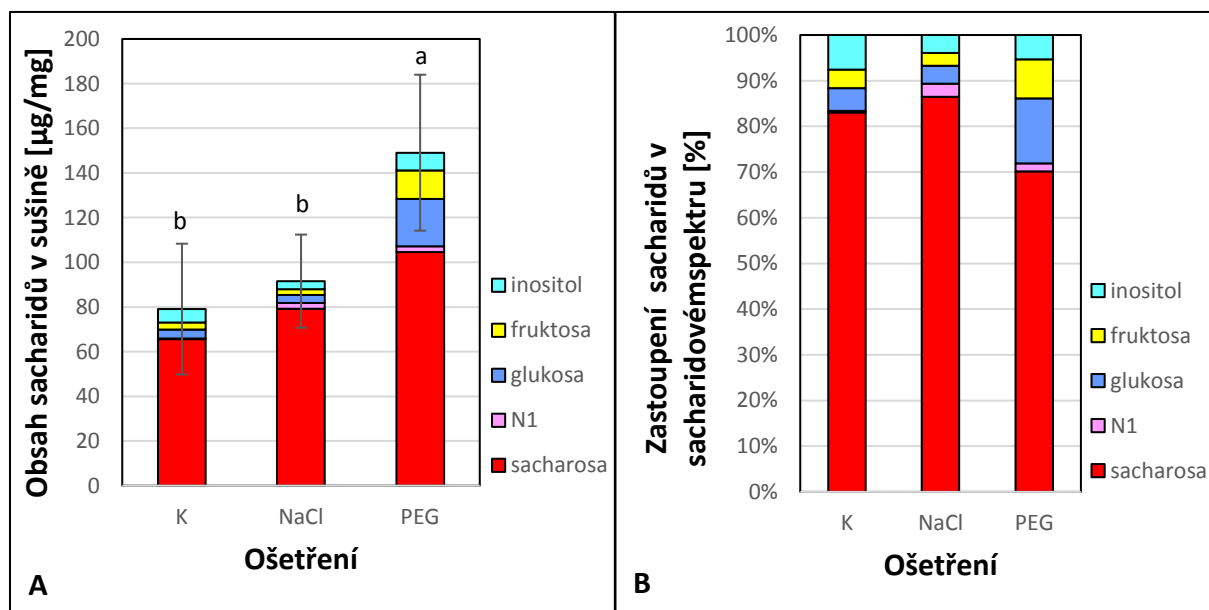
v koncentraci 2 mg/l), se již po 2 týdnech začaly objevovat adventivní prýty (obr. 3A). Po dalších přibližně 2 měsících byly již prýty dostatečně velké a trs mohl být rozdělen na jednotlivé dceřiné rostliny (obr. 3B). Ty si navíc zachovávaly zvýšenou schopnost tvorby adventivních

prýtlů ještě několik měsíců po přesazení na medium bez růstových regulátorů. Tato metoda se tedy velmi osvědčila a byla nadále používána pro množení experimentálního materiálu.

4.3. Vliv působení abiotického stresu na vybrané charakteristiky rostlin *F. vesca*

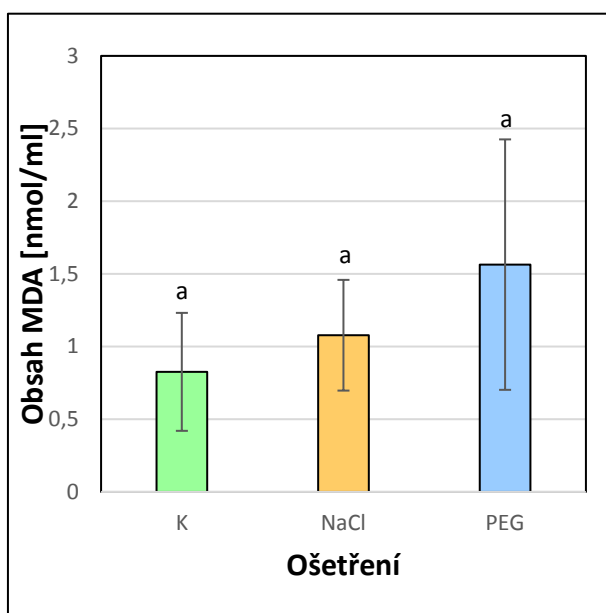
Experiment 1:

V pilotním experimentu byly rostliny *F. vesca* 30 dní vystaveny zasolení (NaCl), kombinujícímu osmotický stres s iontovou toxicitou, a také samotnému osmotickému stresu, navozenému nepenetrujícím osmotikem (PEG). U rostlin pěstovaných na mediu s NaCl byla pozorovatelná pouze mírná tendence ke zvýšení obsahu sacharidů (graf 1A). U rostlin na mediu s PEG již bylo toto zvýšení statisticky průkazné (graf 1A) stejně jako zvýšení podílu hexos na celkovém obsahu sacharidů (graf 1B). U obou stresových ošetření pak došlo ke zvýšení obsahu zatím neidentifikovaného sacharidu (N1), jehož množství u kontroly bylo na hranici detekce. Pro další zjištění rozdílů vyvolaných aplikací NaCl a PEG na rostliny jahodníku byl po vystavení těmto ošetřením změřen také obsah malondialdehydu (MDA)



Graf 1: Obsah a zastoupení endogenních sacharidů v listech rostlin *F. vesca* po 30 dnech působení stresu.

A – obsah sacharidů v sušině; B zastoupení jednotlivých sacharidů v sacharidovém spektru; K – MS medium; NaCl – MS medium + 100 mM NaCl; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; kultivace v klimaboxu; N1 - neidentifikovaný sacharid; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 9 - 10.



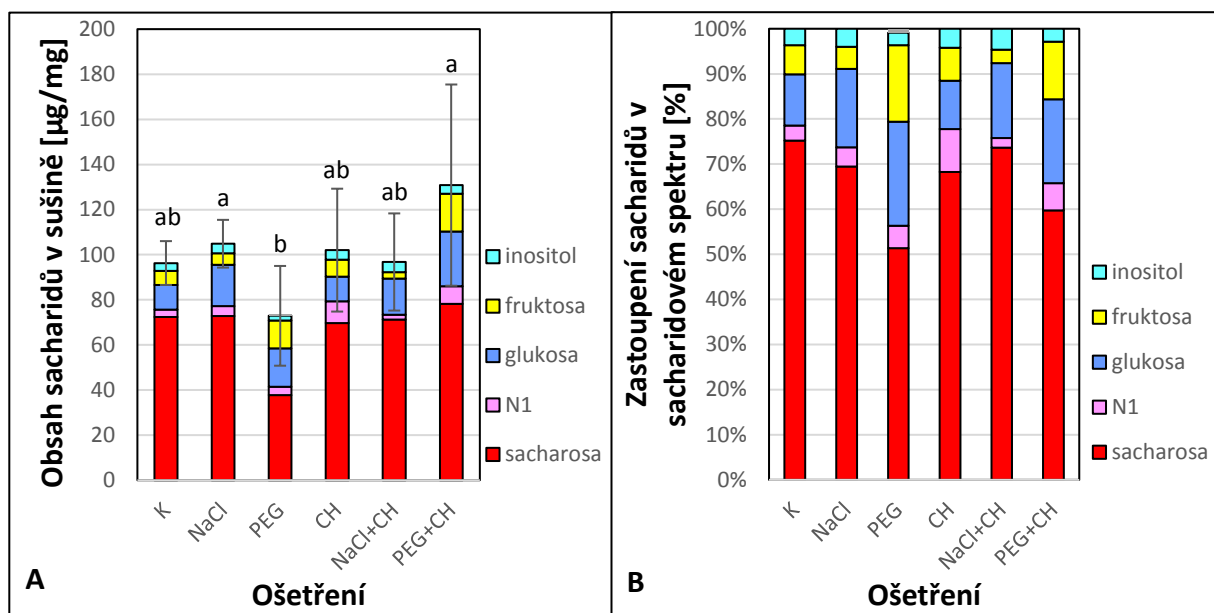
Graf 2: Obsah malondialdehydu v listech rostlin *F. vesca* po 30 dnech působení stresu.

K – MS medium; NaCl – MS medium + 100 mM NaCl; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; $n = 9 - 10$.

v listech. Vzhledem k velkému rozptylu hodnot nebyly výsledky tohoto měření průkazné, ovšem u obou skupin rostlin vystavených stresu byl patrný trend ke zvýšení obsahu MDA oproti kontrole, výraznější pak bylo toto zvýšení u rostlin na mediu s PEG (graf 2).

Experiment 2:

V druhém experimentu bylo zvoleno kratší působení (10 dní) stejných stresových ošetření (NaCl a PEG), a navíc byla přidána jejich kombinace s krátkodobým působením nočního chladu (10 °C od 7. dne kultivace). Samotné působení chladu mělo na obsah a spektrum sacharidů jen minimální vliv. Jedinou nápadnější změnou bylo zvýšení obsahu neidentifikovaného sacharidu N1 (graf 3B). Vliv zasolení v tomto experimentu také nebyl výrazný. Opět zde byla pozorovatelná pouze mírná tendence ke zvýšení celkového obsahu sacharidů. V kombinaci s působením nočního chladu pak nedošlo k žádné změně (graf 3A). Poměrně překvapivé byly výsledky u rostlin na mediu s PEG. Při samotném osmotickém stresu nedošlo ke zvýšení obsahu sacharidů jako v předchozím experimentu (graf 1A). Výsledek se v tomto případě sice průkazně nelišil od kontroly, ale vykazoval spíše klesající trend. Společný pro oba experimenty byl ale průkazně vyšší poměr hexos k celkovému obsahu rozpustných sacharidů (graf 1B a 3B). Kombinace osmotického stresu s chladem pak měla za následek průkazné zvýšení obsahu sacharidů oproti samotnému působení osmotického stresu (graf 3A).

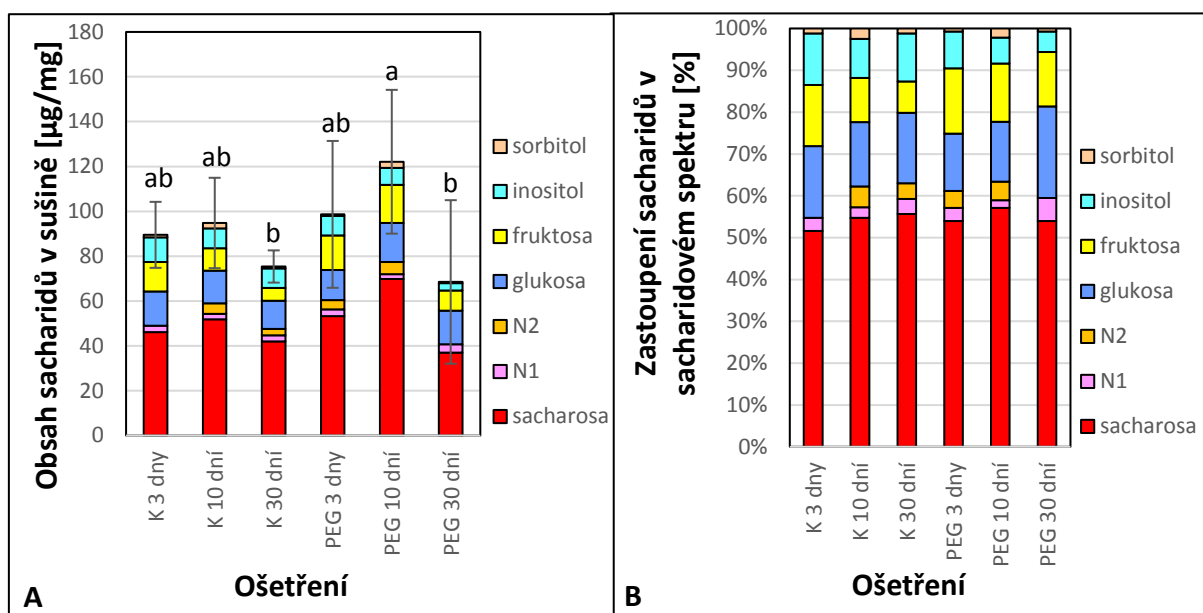


Graf 3: Obsah a zastoupení endogenních sacharidů v listech rostlin *F. vesca* po 10 dnech působení vybraných stresů či jejich kombinace.

A – obsah sacharidů v sušině; B – zastoupení jednotlivých sacharidů v sacharidovém spektru; K – MS medium; NaCl – MS medium + 100 mM NaCl; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; CH – od 7. dne kultivace noční chlad 10 °C; kultivace v klimaboxu; N1 - neidentifikovaný sacharid; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; $n = 6 - 7$.

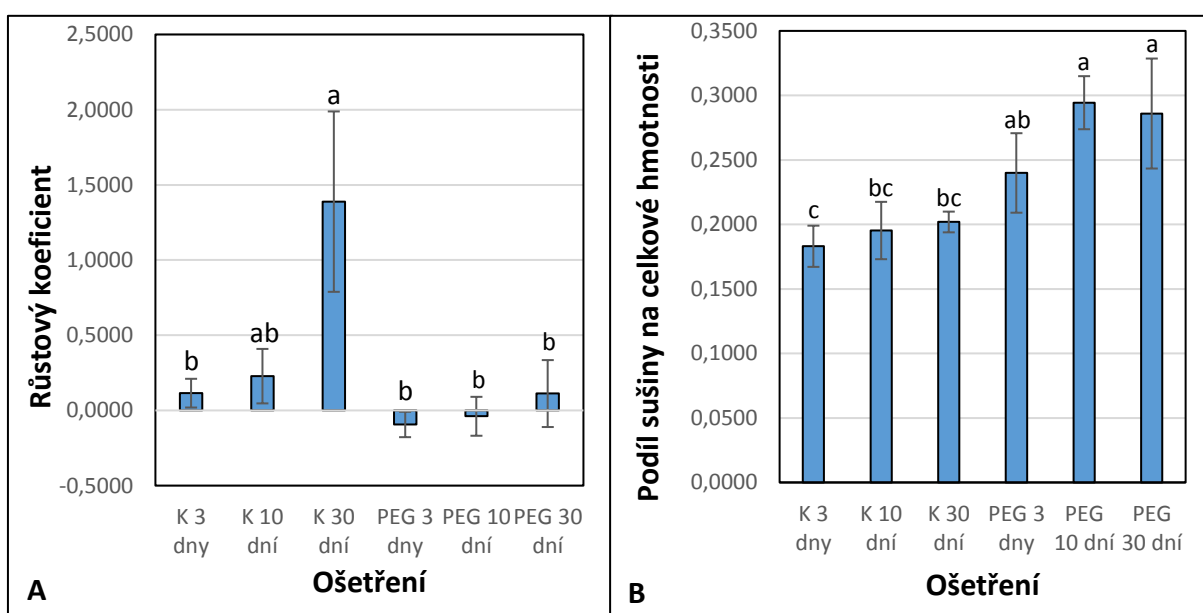
Experiment 3:

Vzhledem k rozporuplným výsledkům působení osmotického stresu v předchozích experimentech, které se lišily pouze délkou působení stresu, byl další experiment zaměřen na sledování vlivu délky působení tohoto stresu. Bylo zjištěno, že délka kultivace jahodníků na mediu s PEG měla průkazný vliv na celkový obsah sacharidů. Nicméně výsledky nebyly v souladu s předchozími experimenty. Po 10 dnech působení osmotického stresu byla zřetelná spíše tendence ke zvýšení celkového obsahu sacharidů, a po 30 dnech pak došlo k jeho průkaznému snížení (graf 4A). Co se týče zastoupení jednotlivých sacharidů ve spektru, nedošlo k výrazným změnám. U dvou stresových a dvou kontrolních skupin byl detekován další neidentifikovaný sacharid (N2), ale jeho množství nevykazovalo závislost na působení stresu (graf 4B). Dále bylo zjištěno, že osmotický stres výrazně omezoval růst jahodníků, což se projevilo zejména po delší době kultivace (graf 5A). Zároveň také tento stres průkazně způsoboval snížení obsahu vody v rostlině. To je znázorněno v grafu 5B jako zvýšení podílu sušiny na čerstvé hmotnosti. K úbytku vody v rostlinách působením osmotického stresu docházelo hlavně v počátcích kultivace, po 10 dnech již obsah vody



Graf 4: Vývoj obsahu a zastoupení endogenních sacharidů v listech rostlin *F. vesca* během působení osmotického stresu.

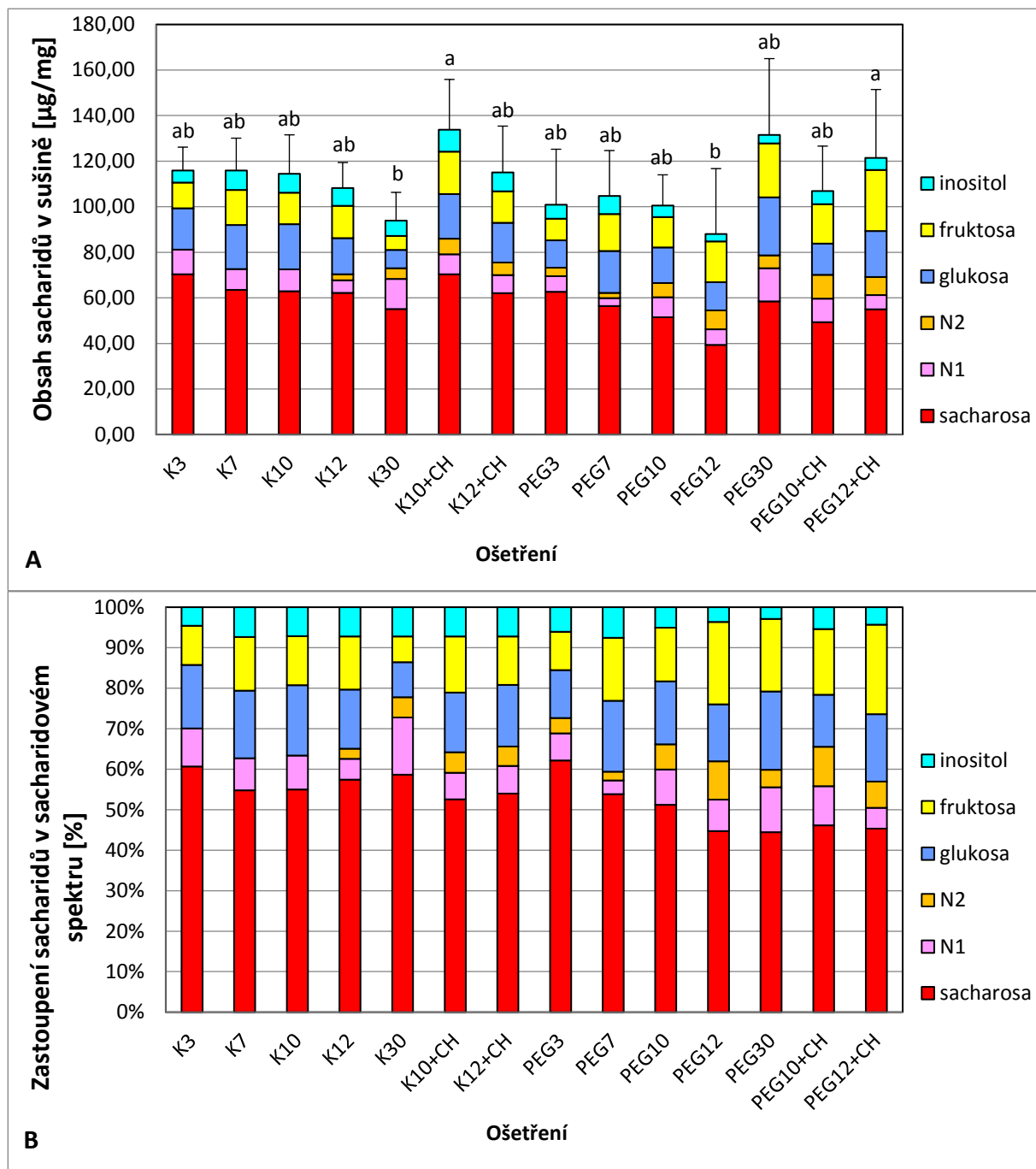
A – obsah sacharidů v sušině; B – zastoupení jednotlivých sacharidů sacharidovém spektru; K – MS medium; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; N1 a N2 - neidentifikované sacharidy; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 6.



Graf 5: Růstový koeficient a podíl sušiny na čerstvé hmotnosti u rostlin *F. vesca* v průběhu působení osmotického stresu.

A – růstový koeficient vypočítaný jako (konečná čerstvá hmotnost - počáteční čerstvá hmotnost) / počáteční čerstvá hmotnost; B – podíl sušiny na čerstvé hmotnosti vypočítaný jako suchá hmotnost / čerstvá hmotnost; K – MS medium; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 6.

neklesal. Trend mírného úbytku vody v rostlinách byl znatelný i u kontrolních rostlin, a to v celém průběhu kultivace.

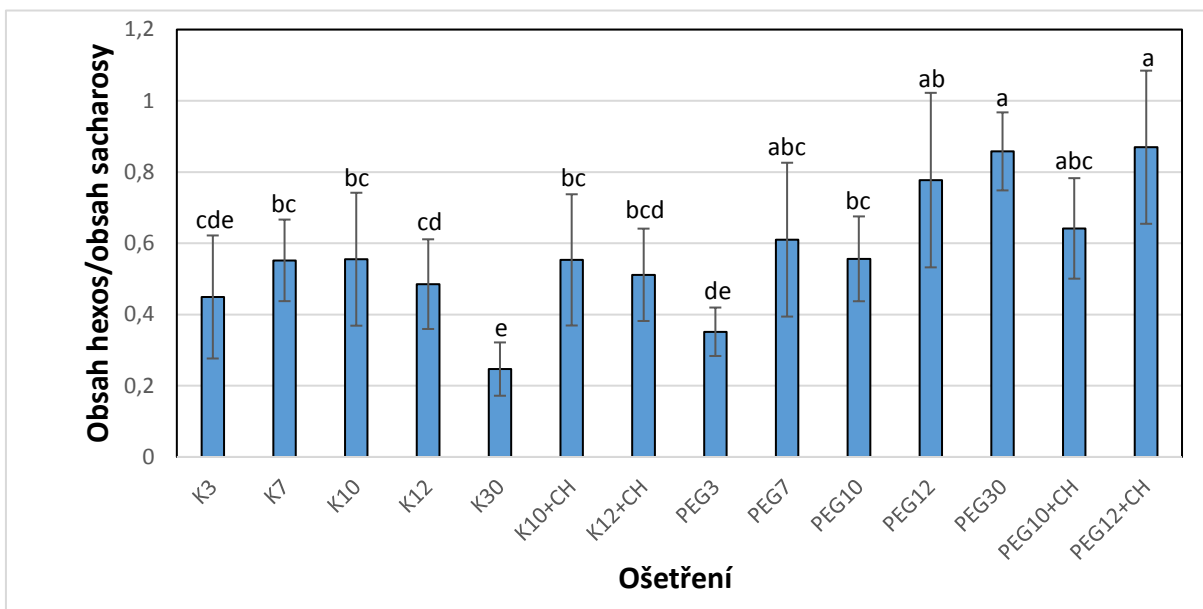


Graf 6: Vývoj obsahu a zastoupení endogenních sacharidů v listech rostlin *F. vesca* při působení vybraných stresů či jejich kombinace.

A – obsah sacharidů v sušině; B – zastoupení jednotlivých sacharidů v sacharidovém spektru; K – MS medium; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; CH – od 7. dne kultivace noční chlad 10 °C; 3, 7, 10, 12, 30 – počet dnů kultivace; N1 a N2 - neidentifikované sacharidy; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 6 – 7 (u ošetření PEG30 n = 4).

Experiment 4:

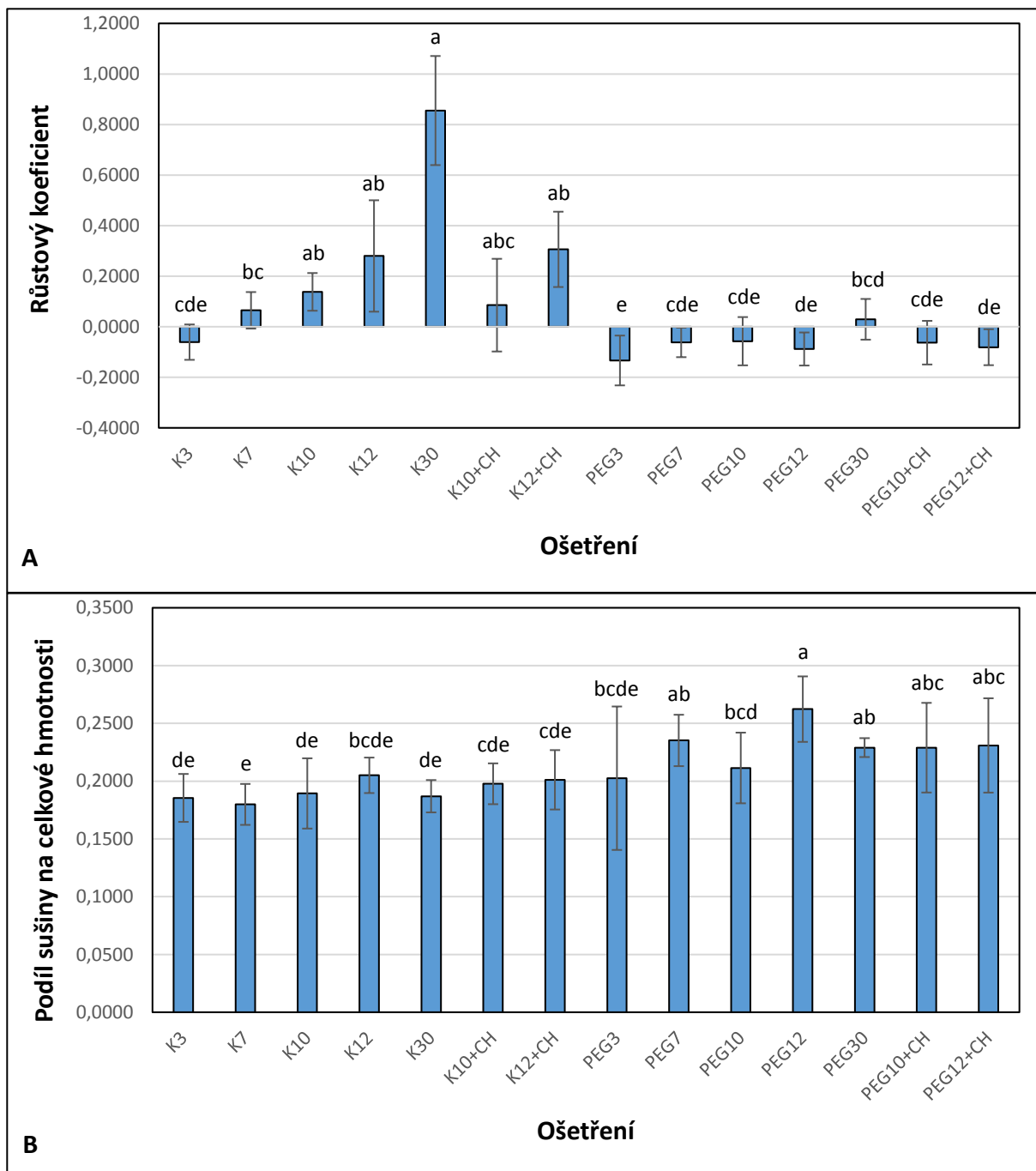
Ve čtvrtém experimentu byl pro ověření znovu zkoumán vliv délky působení osmotického stresu, a navíc také jeho kombinace s chladem. Samotný osmotický stres v počátečních fázích působení vedl ke klesajícímu trendu v obsahu sacharidů. Podobný trend bylo možné pozorovat v průběhu času i u rostlin kontrolních, ale jen v menší míře. V konečné fázi kultivace pak došlo u rostlin na mediu s PEG k obratu v trendu, zatímco u kontrolních rostlin pokračoval trend klesající (graf 6A). Tyto výsledky jsou v rozporu s předchozím experimentem, ovšem poměrně dobře se shodují s experimenty 1 a 2. Zajímavé je, že i samotné působení chladu v tomto experimentu způsobilo výraznou tendenci k nárůstu obsahu sacharidů. Nicméně tento nárůst se zdál pouze přechodný. Při kombinaci chladu s osmotickým stresem byl nárůst pomalejší, zato byl trvalejšího charakteru, a rozdíl oproti samotnému působení osmotickému stresu byl navíc průkazný (graf 6A). Co se týče složení sacharidového spektra, z grafů 6B a 7 je patrné, že delší působení osmotického stresu, a také jeho kombinace s chladem, se průkazně projevily zvýšením poměru obsahu hexos k obsahu sacharosy. Také byla naznačena možná spojitost působení stresů se zvýšením obsahu dosud neidentifikovaného sacharidu N2 (graf 6B). Graf 8A pak potvrzuje silný negativní vliv osmotického stresu na růst jahodníků a graf 8B snížení obsahu vody v rostlinách při vystavení



Graf 7: Poměr obsahu hexos k obsahu sacharosy v listech rostlin *F. vesca* při působení vybraných stresů či jejich kombinace.

K – MS medium; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; CH – od 7. dne kultivace noční chlad 10 °C; 3, 7, 10, 12, 30 – počet dnů kultivace; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; $n = 6 - 7$ (u ošetření PEG30 $n = 4$).

osmotickému stresu. Při samotném působení chladu ani jeden z těchto parametrů nebyl významně ovlivněn.

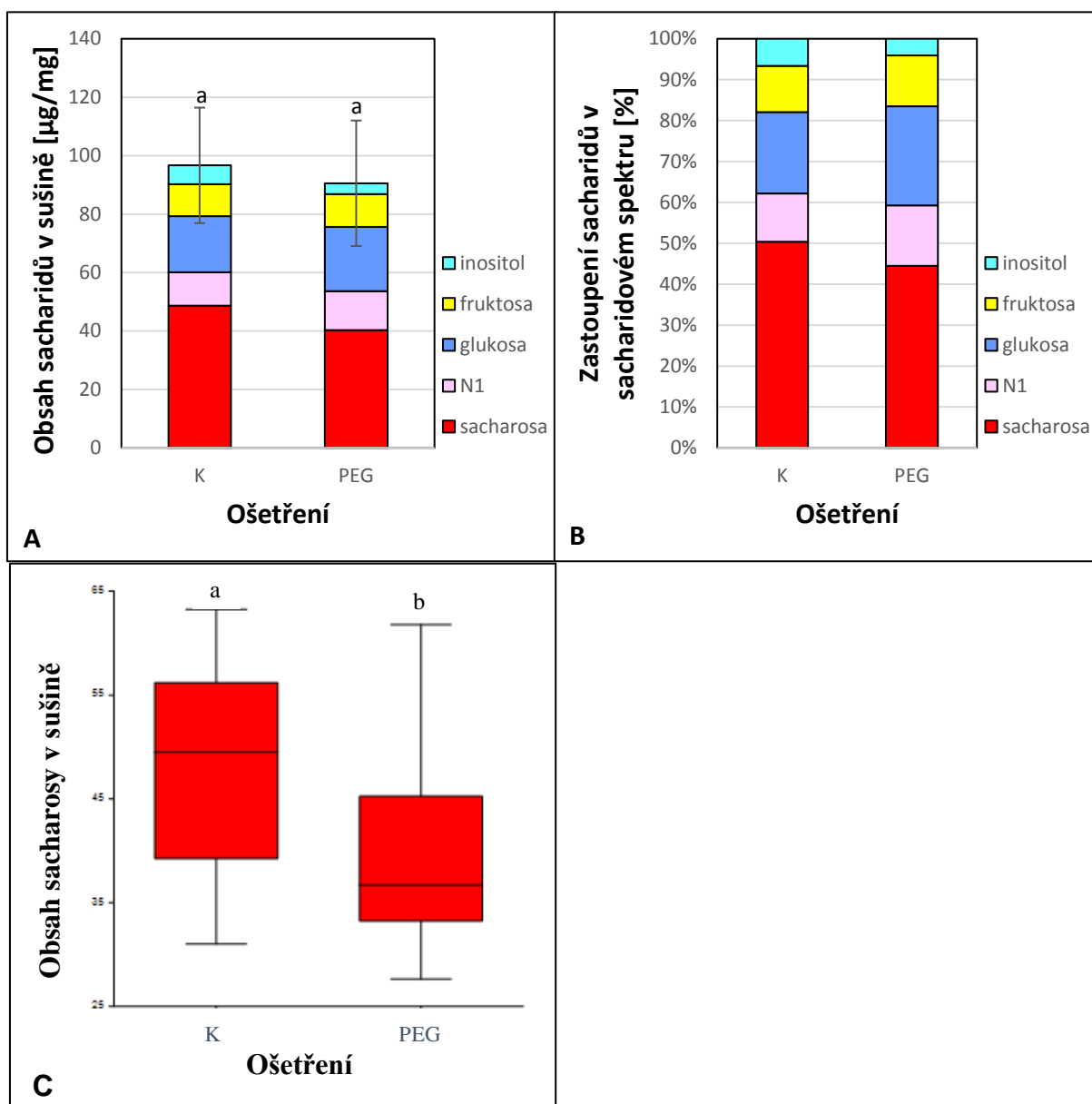


Graf 8: Růstový koeficient a podíl sušiny na čerstvé hmotnosti u rostlin *F. vesca* při působení vybraných stresů či jejich kombinace.

A – růstový koeficient vypočítaný jako (konečná čerstvá hmotnost - počáteční čerstvá hmotnost) / počáteční čerstvá hmotnost; B – podíl sušiny na čerstvé hmotnosti vypočítaný jako suchá hmotnost / čerstvá hmotnost; K – MS medium; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; CH – od 7. dne kultivace noční chlad 10 °C; 3, 7, 10, 12, 30 – počet dnů kultivace; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 6 – 7 (u ošetření PEG30 n = 4).

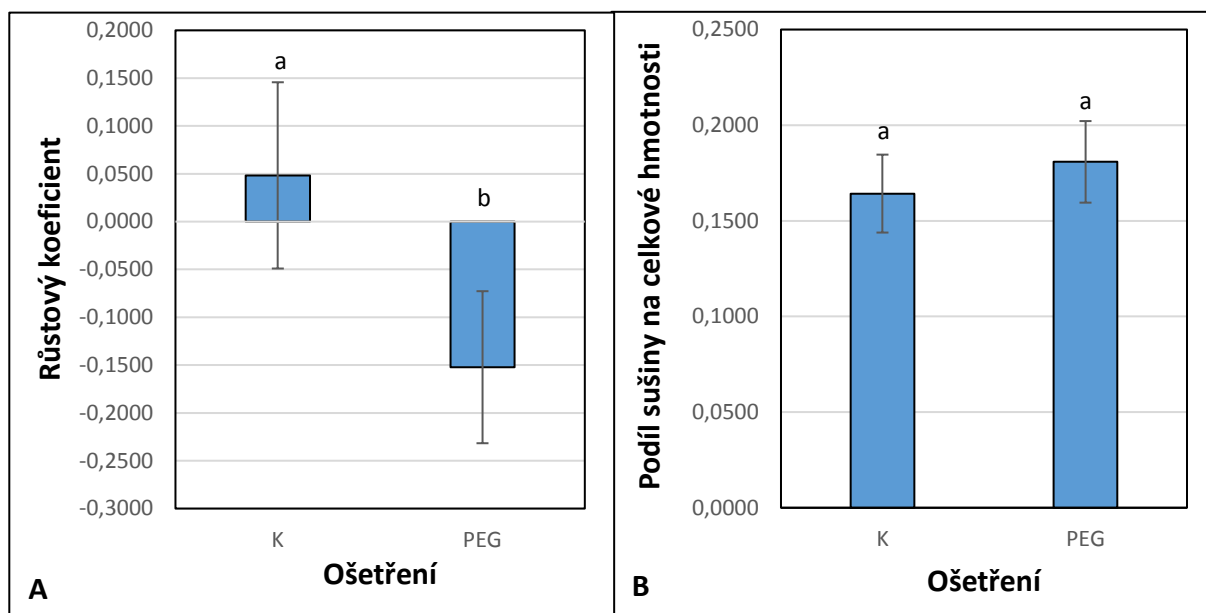
Experiment 5:

Vzhledem k neprůkaznosti většiny výsledků v předchozích pokusech způsobené velkou variabilitou sledovaných parametrů, byl proveden experiment porovnávající pouze kontrolní rostliny s rostlinami kultivovanými 10 dní na mediu s PEG, ovšem tentokrát s vyšším počtem opakování ($n = 14$). Ani zde však rozdíly v celkovém obsahu sacharidů nebyly průkazné.



Graf 9: Obsah a zastoupení endogenních sacharidů v listech rostlin *F. vesca* po 10 dnech působení osmotického stresu.

A – obsah sacharidů v sušině; B – zastoupení jednotlivých sacharidů v sacharidovém spektru; C – obsah sacharosy v sušině znázorněný formou boxplotu; K – MS medium; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; N1 - neidentifikovaný sacharid; chybové úsečky u grafů A a B znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; $n = 14$.



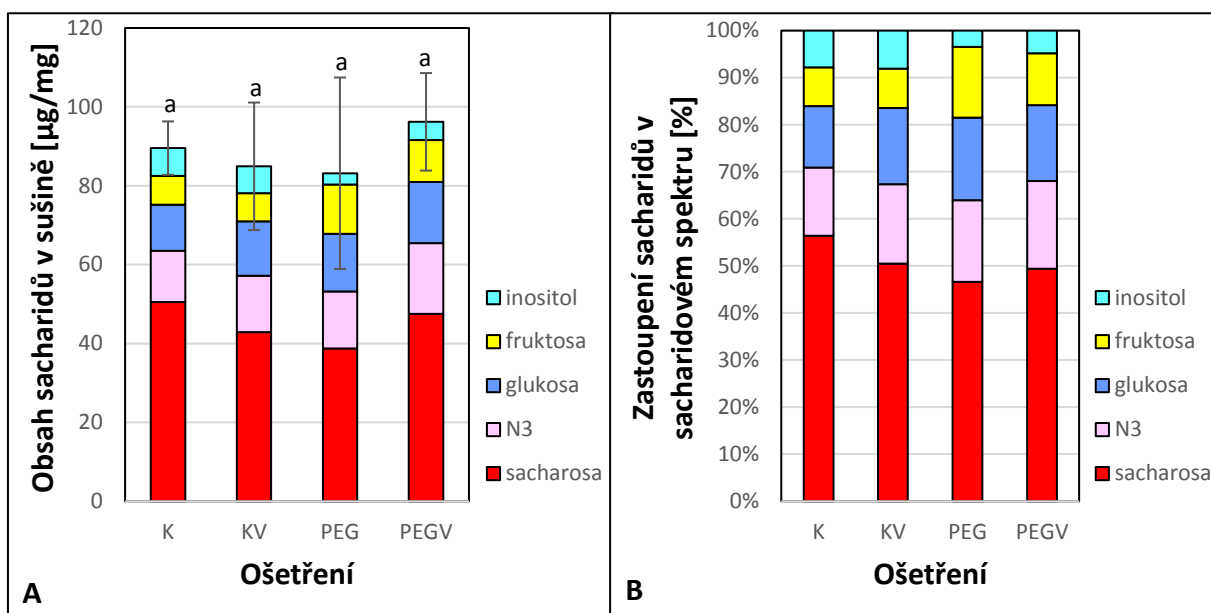
Graf 10: Růstový koeficient a podíl sušiny na čerstvé hmotnosti u rostlin *F. vesca* po 10 dnech působení osmotického stresu.

A – růstový koeficient vypočítaný jako (konečná čerstvá hmotnost - počáteční čerstvá hmotnost) / počáteční čerstvá hmotnost; B – podíl sušiny na čerstvé hmotnosti vypočítaný jako suchá hmotnost / čerstvá hmotnost; K – MS medium; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; $n = 14$.

Výsledky však odpovídají pokusům 2, 4 a 5. Také zde byl po 10 dnech působení osmotického stresu znatelný trend k mírnému snížení celkového obsahu sacharidů a snížení obsahu vody v rostlinách (graf 9A a 10B). Podobně jako v pokusech 2 a 5 bylo možné pozorovat tendenci ke zvýšení poměru hexos k obsahu sacharosy (graf 9B). Průkaznými změnami pak bylo pouze snížení obsahu sacharosy a omezení růstu rostlin (graf 9C a 10A).

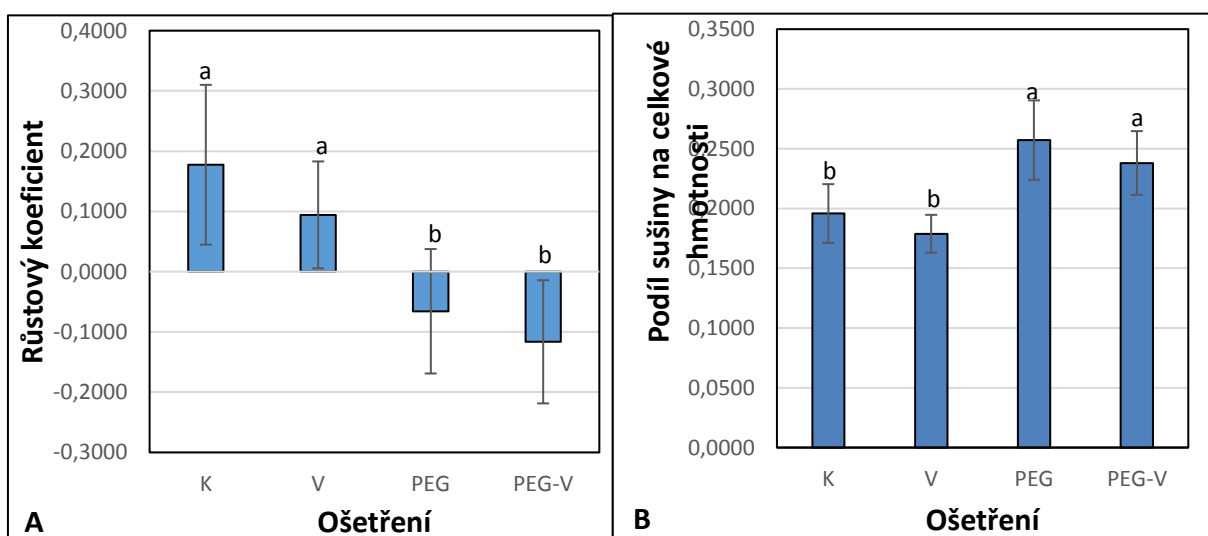
4.4. Vliv aplikace validamycinu A na vybrané parametry rostlin *F. vesca*

V tomto experimentu byl zjišťován vliv specifického inhibitoru trehalasy, validamycinu A, na změny obsahu sacharidů a růstu rostlin, a to v optimálních podmínkách i při vystavení osmotickému stresu. Ani jedno z použitých ošetření nezpůsobilo průkazné změny v obsahu nebo zastoupení rozpustných sacharidů. Při působení validamycinu A v optimálních podmínkách bylo možné pozorovat pouze mírnou tendenci k poklesu obsahu sacharidů, zatímco ve stresových podmínkách byla tendence opačná (graf 11A). Při obou ošetřeních byl u působení validamycinu A mírný trend k omezení růstu a zvýšení obsahu vody v rostlinách (graf 12A a 12B). Ve složení sacharidového spektra došlo vlivem působení validamycinu A pouze k minimálním změnám (graf 11B).



Graf 11: Obsah a zastoupení endogenních sacharidů v listech rostlin *F. vesca* po 10 dnech působení osmotického stresu a aplikaci validamycinu A.

A – obsah sacharidů v sušině; B – zastoupení jednotlivých sacharidů v sacharidovém spektru; K – MS medium; KV – MS medium + 150 μ M validamycinu A; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; PEGV – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000 + 150 μ M validamycinu A; N1 - neidentifikovaný sacharid; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 6 – 7

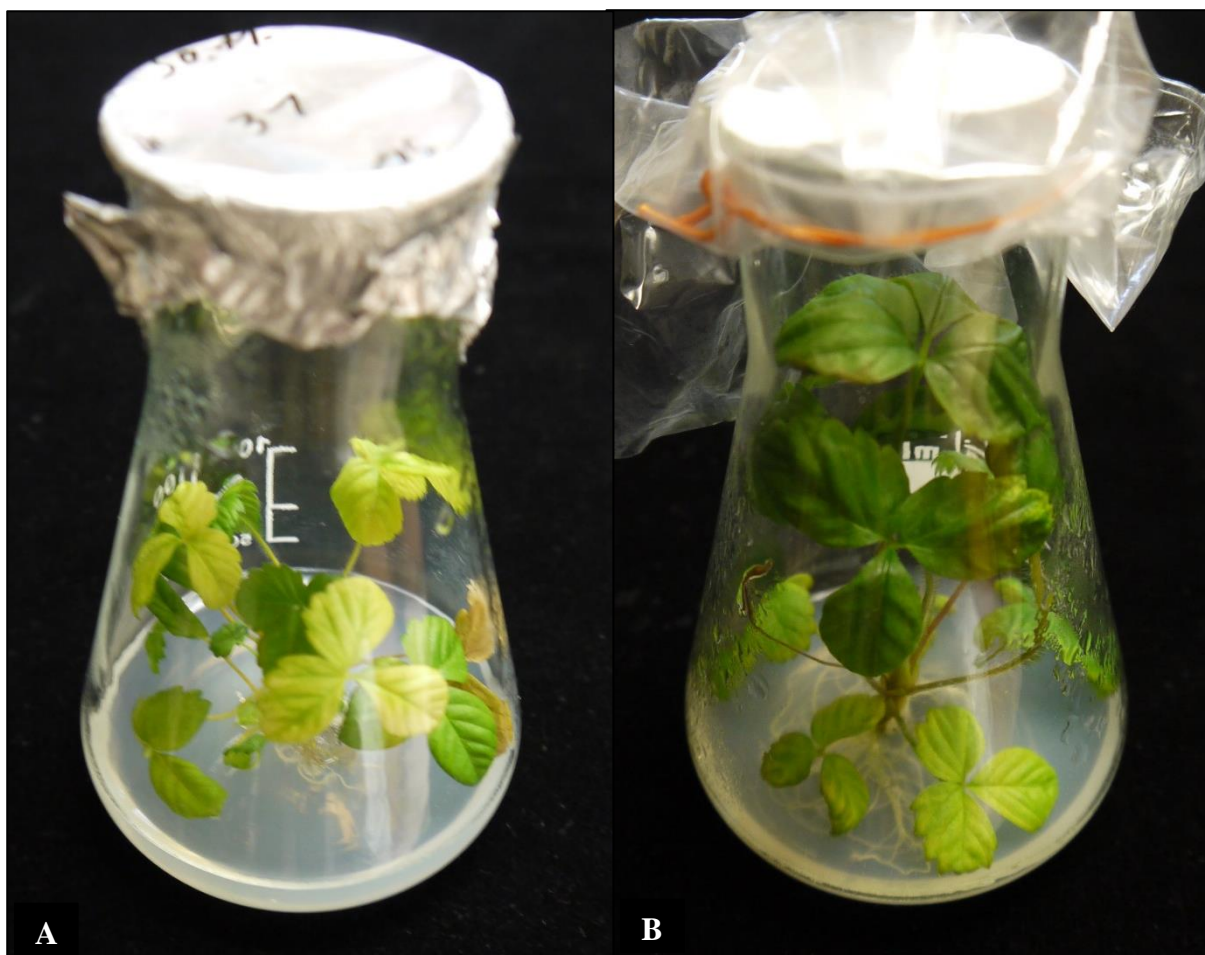


Graf 12: Růstový koeficient a podíl sušiny na čerstvé hmotnosti u rostlin *F. vesca* po 10 dnech působení osmotického stresu a aplikaci validamycinu A.

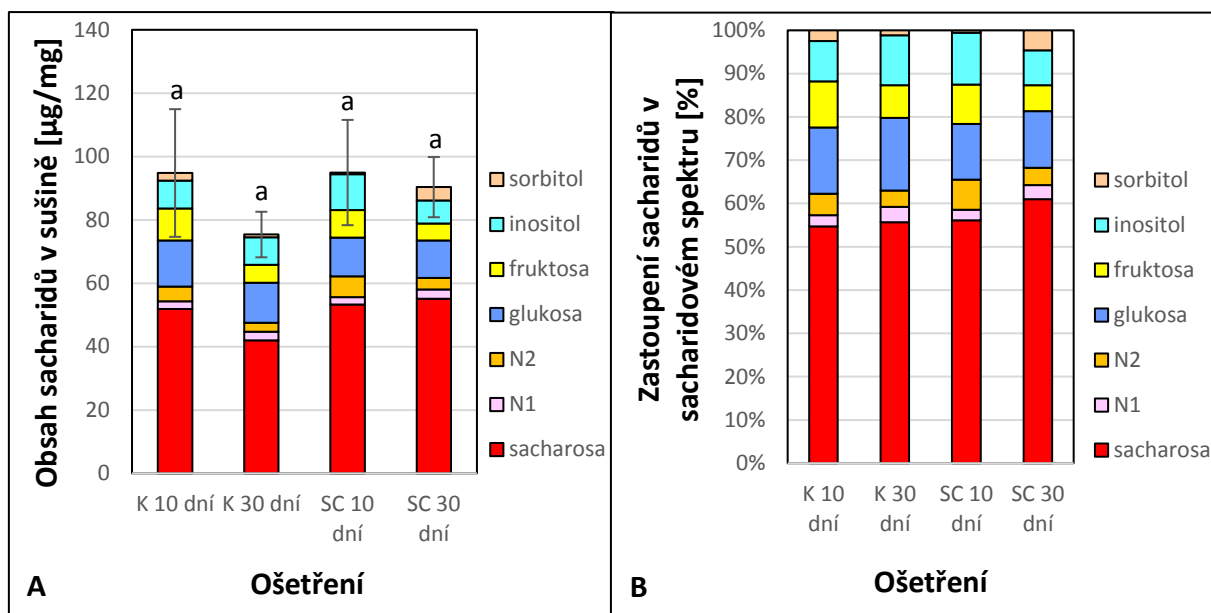
A – růstový koeficient vypočítaný jako (konečná čerstvá hmotnost - počáteční čerstvá hmotnost) / počáteční čerstvá hmotnost; B – podíl sušiny na čerstvé hmotnosti vypočítaný jako suchá hmotnost / čerstvá hmotnost; K – MS medium; KV – MS medium + 150 μ M validamycinu A; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; PEGV – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000 + 150 μ M validamycinu A; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 6 – 7.

4.5. Vliv fotoautotrofní kultivace *in vitro* na vybrané parametry rostlin

V tomto experimentu byl zjišťován vliv autotrofní kultivace *in vitro* na růst a obsah sacharidů v rostlinách jahodníku. Autotrofní kultivace byla zajištěna absencí sacharidu v mediu a uzavřením baněk uzávěry sun cap, umožňujícími volnou výměnu plynů mezi baňkou a okolím. Takto pěstované rostliny rostly lépe než při klasické mixotrofní kultivaci (graf 14A). Nicméně i když byly rozdíly pozorovatelné pouhým pohledem, vzhledem k velkému rozptylu hodnot nebyly statisticky průkazné. Celkový obsah sacharidů a složení jejich spektra bylo zvláště z počátku kultivace u obou skupin v podstatě shodné (graf 13A a 13B). V pozdější fázi pak byla u kontrolních rostlin zřetelná tendence k poklesu obsahu sacharidů stejně jako v předchozích experimentech, zatímco u autotrofně kultivovaných rostlin k tomuto poklesu téměř nedocházelo. Obsah vody v rostlinách byl při obou způsobech kultivace téměř stejný (graf 14B).

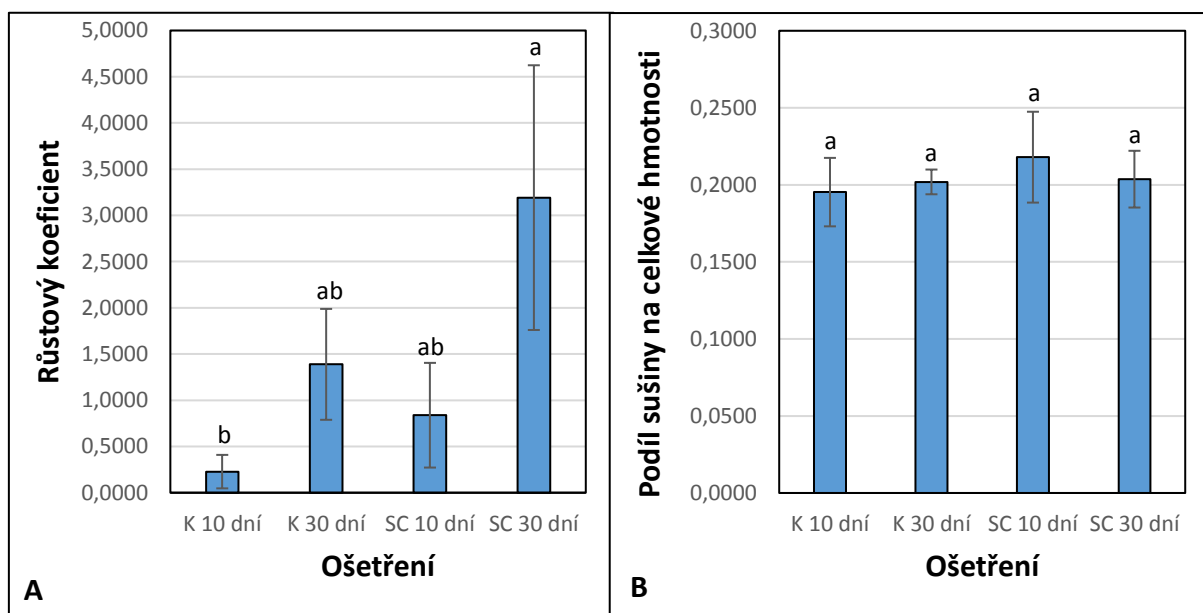


Obrázek 4: Rozdíl mezi rostlinami po 30 dnech mixotrofní (A) a autotrofní (B) kultivace.



Graf 13: Vývoj obsahu a zastoupení endogenních sacharidů v listech rostlin *F. vesca*, pěstovaných pod uzávěry sun cap.

A – obsah sacharidů v sušině; B – zastoupení jednotlivých sacharidů v sacharidovém spektru; K – MS medium, uzávěry baněk z alobalu; SC – MS medium bez sacharosy, uzávěry sun cap; N1 a N2 - neidentifikované sacharidy; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; $n = 6$.



Graf 14: Růstový koeficient a podíl sušiny na čerstvé hmotnosti u rostlin *F. vesca*, pěstovaných pod uzávěry sun cap.

A – růstový koeficient vypočítaný jako (konečná čerstvá hmotnost - počáteční čerstvá hmotnost) / počáteční čerstvá hmotnost; B – podíl sušiny na čerstvé hmotnosti vypočítaný jako suchá hmotnost / čerstvá hmotnost; K – MS medium, uzávěry baněk z alobalu; SC – MS medium bez sacharosy, uzávěry sun cap; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; $n = 6$.

4.6. Odvození a kultivace kalusové kultury

4.6.1. Indukce tvorby kalusu pomocí kyseliny naftyloctové a 2,4-dichlorfenoxyoctové

Kultivační medium s uvedenými růstovými regulátory, každým v koncentraci 1 mg/l, se pro indukci kalusu u *F. vesca* ukázalo jako použitelné. Segmenty řapíků, zvolené jako primární explantáty, byly na tomto mediu kultivovány 3 měsíce. Během té doby došlo u části z nich k zahnědnutí a odumření a u části k vytvoření kalusu (obr. 5).



Obrázek 5: Kalusy vzniklé z řapíkových segmentů po 3 měsících kultivace na mediu s NAA a 2,4-D.

4.6.2. Indukce tvorby kalusu pomocí kyseliny naftyloctové a 6-benzylaminopurinu

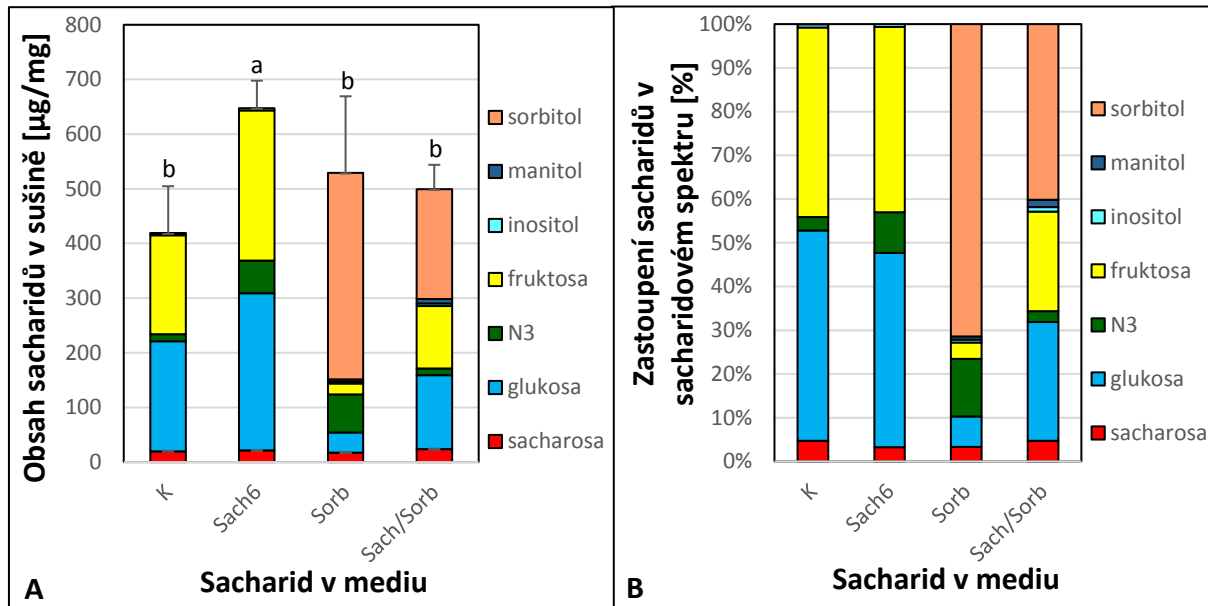
Medium s přídavkem NAA v koncentraci 4 mg/l a BAP v koncentraci 2 mg/l se pro indukci kalusů *F. vesca* velmi osvědčilo. Jako primární explantát sloužily opět segmenty řapíků. Už po 2 měsících jejich kultivace na tomto mediu došlo u téměř všech ke vzniku kalusů (obr. 6) a jen minimum z nich odumřelo. Schopnost indukce tvorby kalusu u tohoto media byla tedy výrazně vyšší než u media předchozího. V obou případech pak byla indukce úspěšnější při kultivaci v trvalé tmě než při 16 hodinové fotoperiodě. Jediným nedostatkem tohoto media byl občasný vznik kořenů na povrchu kalusu. Tento nedostatek byl však snadno odstraněn zvýšením koncentrace BAP z 2 mg/l na 2,5 mg/l. Takto upravené medium bylo následně používáno pro kultivaci kalusů na experimenty.



Obrázek 6: Kalusy vzniklé z řapíkových segmentů po 2 měsících kultivace na mediu s NAA a BAP.

4.6.3 Vlivu typu exogenního sacharidu na vybrané charakteristiky kalusových kultur *F. vesca*

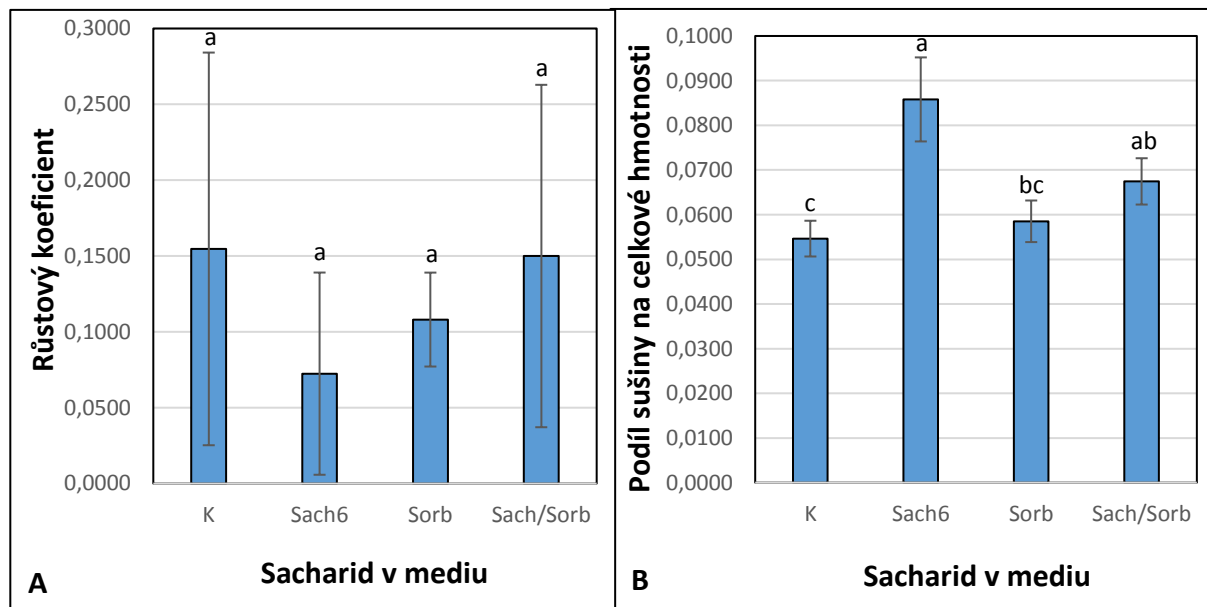
Po odvození kalusu z rostlin *F. vesca* byla nejdříve zjišťována schopnost této heterotrofní kultury přijímat a utilizovat různé sacharidy z media. Kontrolní kalusy kultivované na MS mediu se 3 % sacharosy rostly nejlépe ze všech variant a srovnatelný byl růst ještě na mediu s 1,5 % sacharosy a 1,5 % sorbitolu.



Graf 15: Obsah a zastoupení endogenních sacharidů v kalusech *F. vesca* po 14 dnech kultivace v závislosti na typu sacharidu v médiu.

A – obsah sacharidů v sušině; B – zastoupení jednotlivých sacharidů v sacharidovém spektru; K – MS medium (se 3 % sacharosy); Sach6 – MS medium se 6 % sacharosy; Sorb – MS medium se 3 % sorbitolu; Sach/Sorb – MS medium s 1,5 % sacharosy + 1,5 % sorbitolu; N3 – neidentifikovaný sacharid; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; $n = 7$.

Na mediu se 3 % sorbitolu byla již znatelná tendence ke zhoršenému růstu, a ještě výraznější byla tato tendence u kalusů na mediu se 6 % sacharosy (graf 16A), kde měly také výrazně nižší obsah vody oproti kontrole (graf 16B). Obsahy sacharidů v kalusech (grafy 15A a 15B), do značné míry kopírovaly obsahy sacharidů v mediu, pouze sacharosa přijímaná z media byla v kalusech štěpena na hexosy. Zajímavé je pak zvýšení neidentifikovaného sacharidu N3 u kalusů na mediu se 6 % sacharosy a 3 % sorbitolu.



Graf 16: Růstový koeficient a podíl sušiny na čerstvé hmotnosti u kalusů *F. vesca*, po 14 dnech kultivace v závislosti na typu sacharidu v médiu.

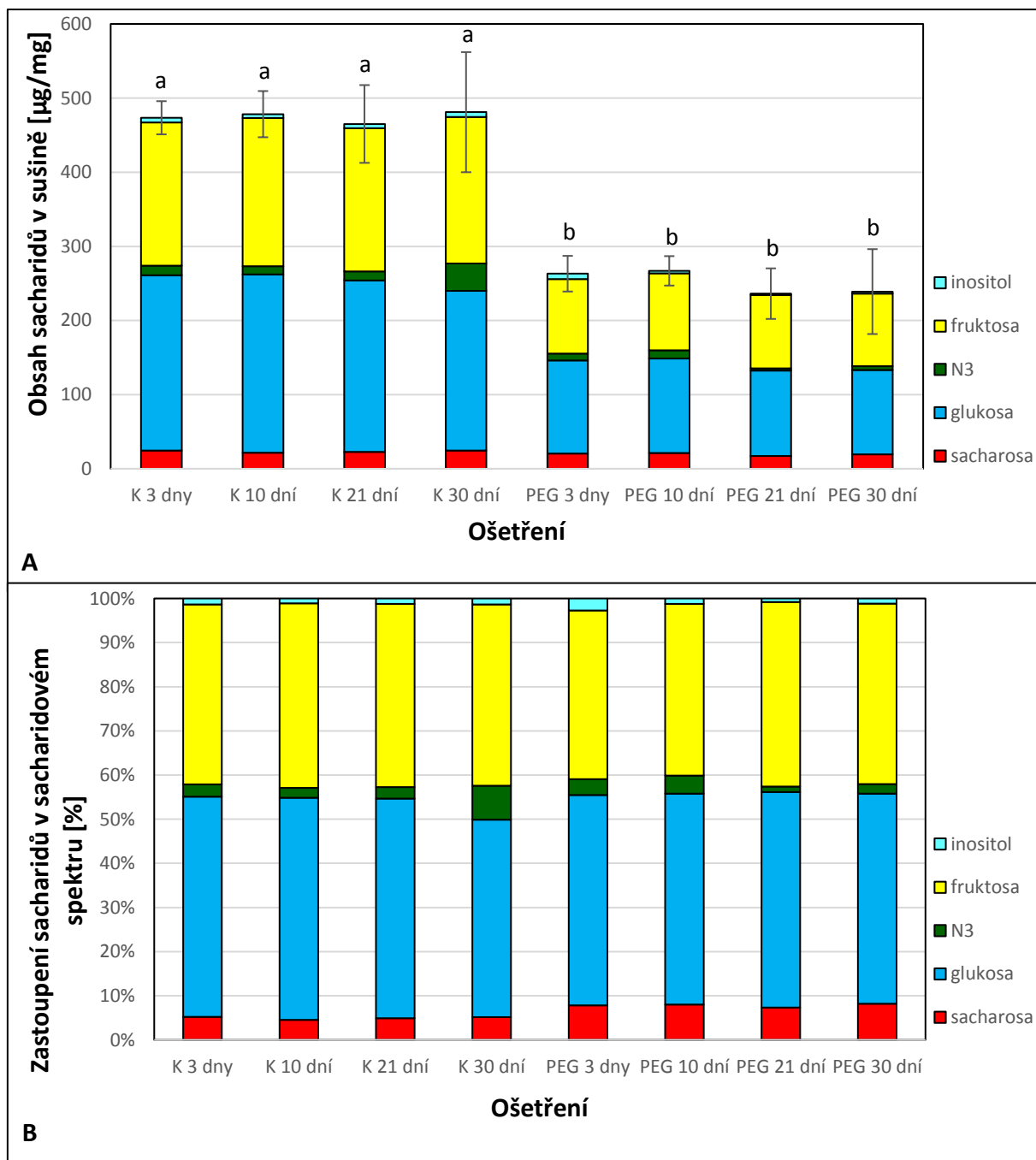
A – růstový koeficient vypočítaný jako (konečná čerstvá hmotnost - počáteční čerstvá hmotnost) / počáteční čerstvá hmotnost; B – podíl sušiny na čerstvé hmotnosti vypočítaný jako suchá hmotnost / čerstvá hmotnost; K – MS medium (se 3 % sacharosy); Sach6 – MS medium se 6 % sacharosy; Sorb – MS medium se 3 % sorbitolu; Sach/Sorb – MS medium s 1,5 % sacharosy + 1,5 % sorbitolu; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; $n = 7$.

4.7. Vliv působení abiotického stresu na vybrané charakteristiky kalusových kultur *F. vesca*

Experiment 1:

Vzhledem k tomu, že u rostlin *F. vesca* byly pozorovány různé změny v obsahu sacharidů v závislosti na délce působení osmotického stresu, byla v dalším experimentu sledována odpověď v průběhu působení tohoto stresu i u kalusů. Jak je vidět z grafů 17A a 17B, osmotický stres u kalusů průkazně způsobil výrazné snížení obsahu sacharidů, zejména

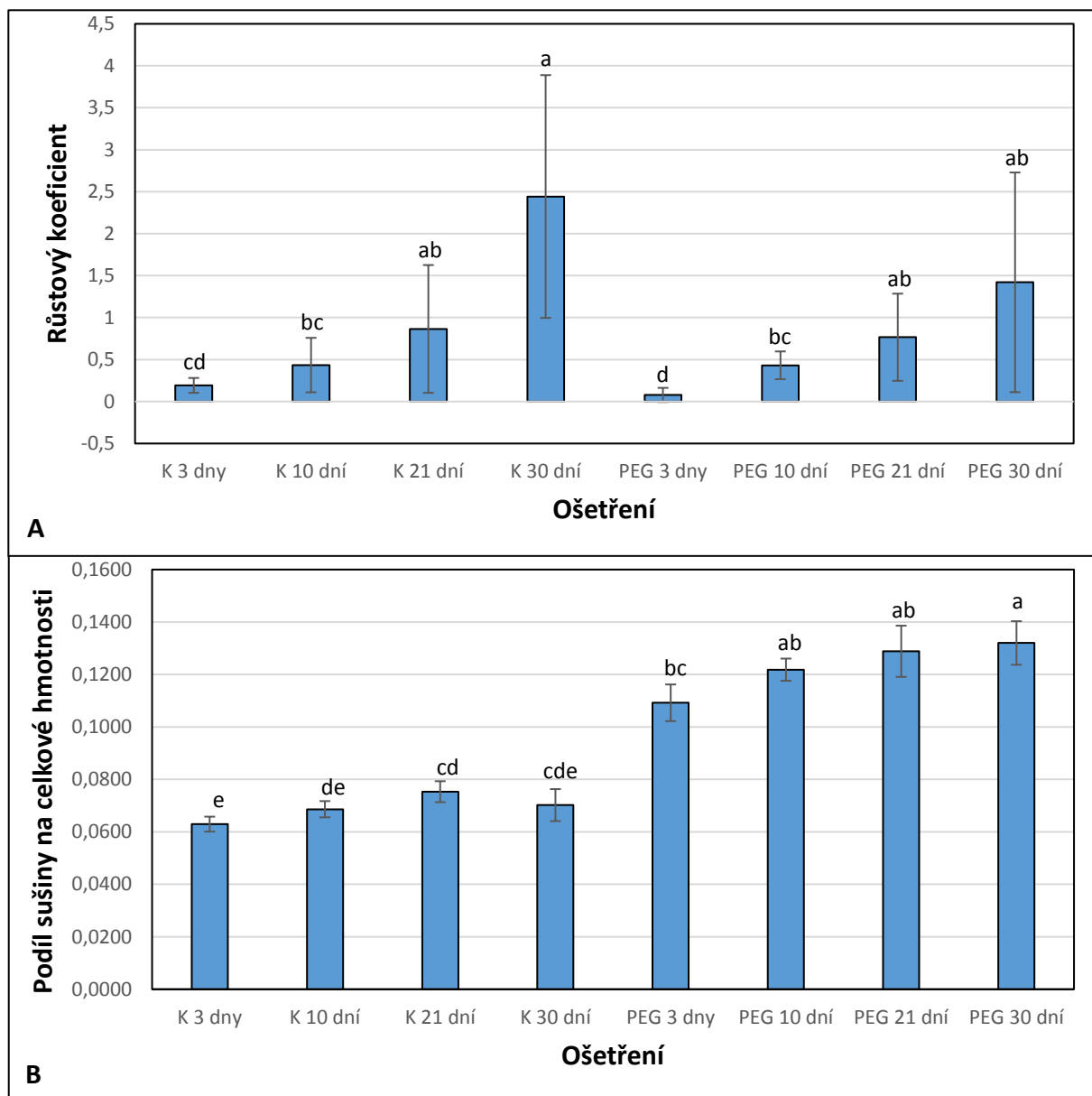
hexos. K tomuto snížení došlo bezprostředně po vystavení stresu a následně v celém průběhu jeho působení již zůstal obsah sacharidů konstantní.



Graf 17: Vývoj obsahu a spektra endogenních sacharidů v kalusech *F. vesca* při působení osmotického stresu.

A – obsah sacharidů v sušině; B – zastoupení jednotlivých sacharidů v sacharidovém spektru; K – MS medium; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; N3 - neidentifikovaný sacharid; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; $n = 7 - 8$.

U kontrolních kalusů pak bylo možné pozorovat v poslední fázi kultivace tendenci ke zvýšení obsahu neidentifikovaného sacharidu N3. Omezení růstu kalusů při působení osmotického stresu zde nebylo prokázáno (graf 18A). Signifikantní však bylo snížení obsahu vody v kalusech při tomto ošetření, které se navíc prohlubovalo s délkou působení stresu (graf 18B).

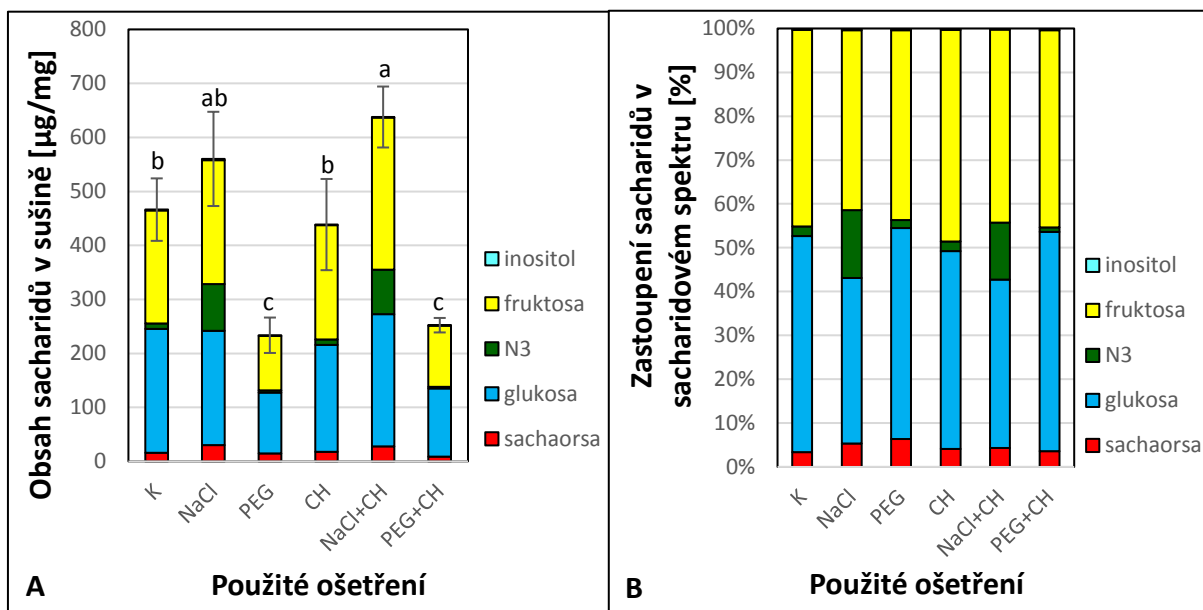


Graf 18: Růstový koeficient a podíl sušiny na čerstvé hmotnosti u kalusů *F. vesca* v průběhu působení osmotického stresu.

A – růstový koeficient vypočítaný jako (konečná čerstvá hmotnost - počáteční čerstvá hmotnost) / počáteční čerstvá hmotnost; B – podíl sušiny na čerstvé hmotnosti vypočítaný jako suchá hmotnost / čerstvá hmotnost; K – MS medium; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 7 – 8.

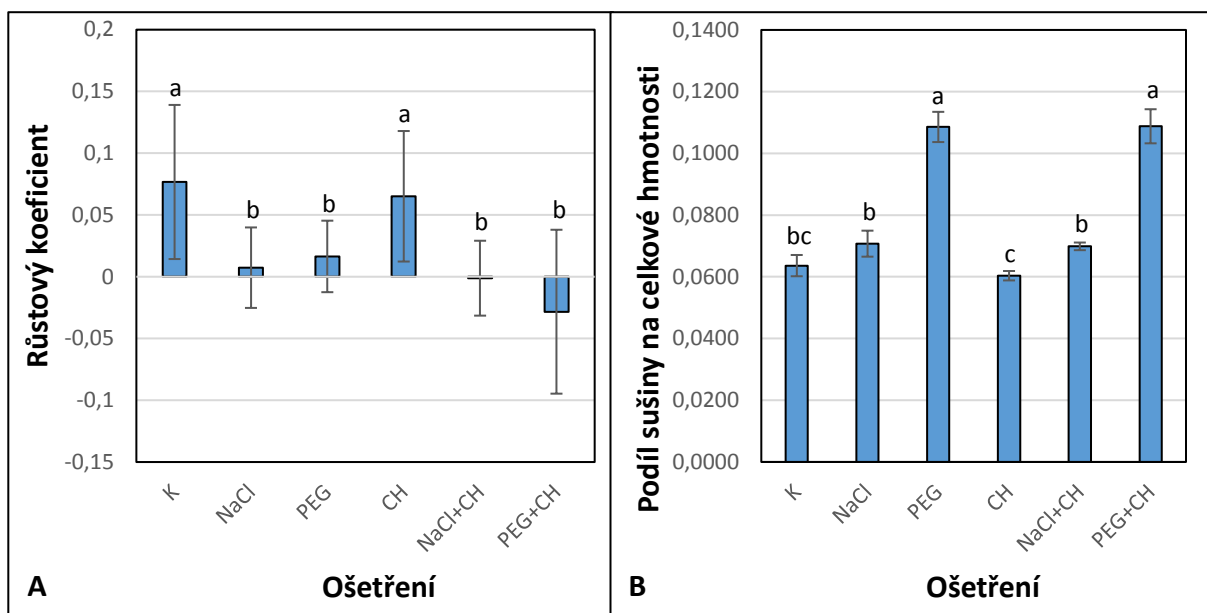
Experiment 2:

V tomto experimentu byla sledována odpověď kalusů na osmotický stres, zasolení, krátkodobý noční chlad, a jejich vzájemné kombinace. Samotné působení chladu, mělo na obsah sacharidů opět jen minimální vliv. Působení osmotického stresu způsobilo výrazné snížení obsahu sacharidů, zvláště hexos, což souhlasí s výsledky z předchozího experimentu. Téměř stejně snížený obsah sacharidů byl zaznamenán i u kalusů vystavených osmotickému stresu v kombinaci s chladem (graf 19A). Naproti tomu při zasolení bylo možné pozorovat výraznou tendenci ke zvýšení celkového obsahu sacharidů, způsobenému zejména zvýšením neidentifikovaného sacharidu N3 (grafy 19A a 19B). Při kombinaci zasolení a chladu, pak bylo toto zvýšení v obsahu sacharidů průkazné. Graf 20A ukazuje, že samotný chlad příliš neovlivnil ani růst kalusů, zatímco osmotický stres i zasolení růst značně omezily, a ještě výraznější bylo toto omezení při kombinaci stresů, zvláště pak chladu se stresem osmotickým. Snížení obsahu vody u kalusů rostoucích na mediu s PEG, pozorované v předchozím experimentu, se zde potvrdilo, a to i při kombinaci s chladem. U žádného jiného stresu ale k podobně výrazné změně v obsahu vody nedošlo (graf 20B).



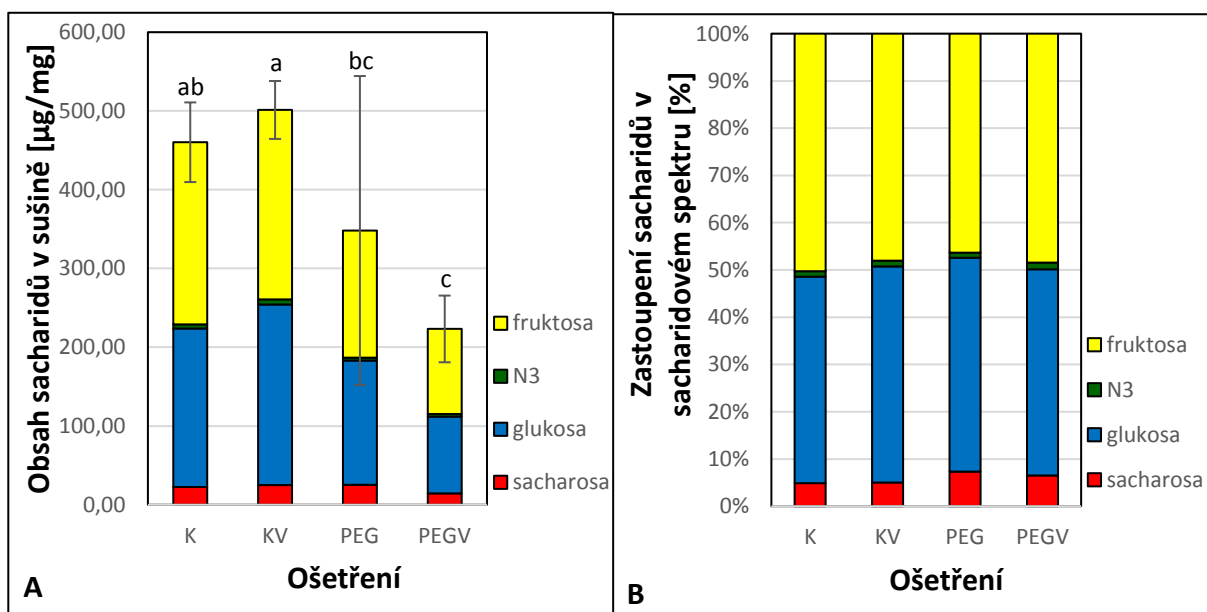
Graf 19: Obsah a zastoupení endogenních sacharidů v kalusech *F. vesca* po 10 dnech působení vybraných stresů či jejich kombinace.

A – obsah sacharidů v sušině; B – zastoupení jednotlivých sacharidů v sacharidovém spektru; K – MS medium; NaCl – MS medium + 100 mM NaCl; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; CH – od 7. dne kultivace noční chlad 10 °C; N3 - neidentifikovaný sacharid; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 8.



Graf 20: Růstový koeficient a podíl sušiny na čerstvé hmotnosti u kalusů *F. vesca* po 10 dnech působení vybraných stresů či jejich kombinace.

A – růstový koeficient vypočítaný jako (konečná čerstvá hmotnost - počáteční čerstvá hmotnost) / počáteční čerstvá hmotnost; B – podíl sušiny na čerstvé hmotnosti vypočítaný jako suchá hmotnost / čerstvá hmotnost; K – MS medium; NaCl – MS medium + 100 mM NaCl; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; CH – od 7. dne kultivace noční chlad 10 °C; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 8.

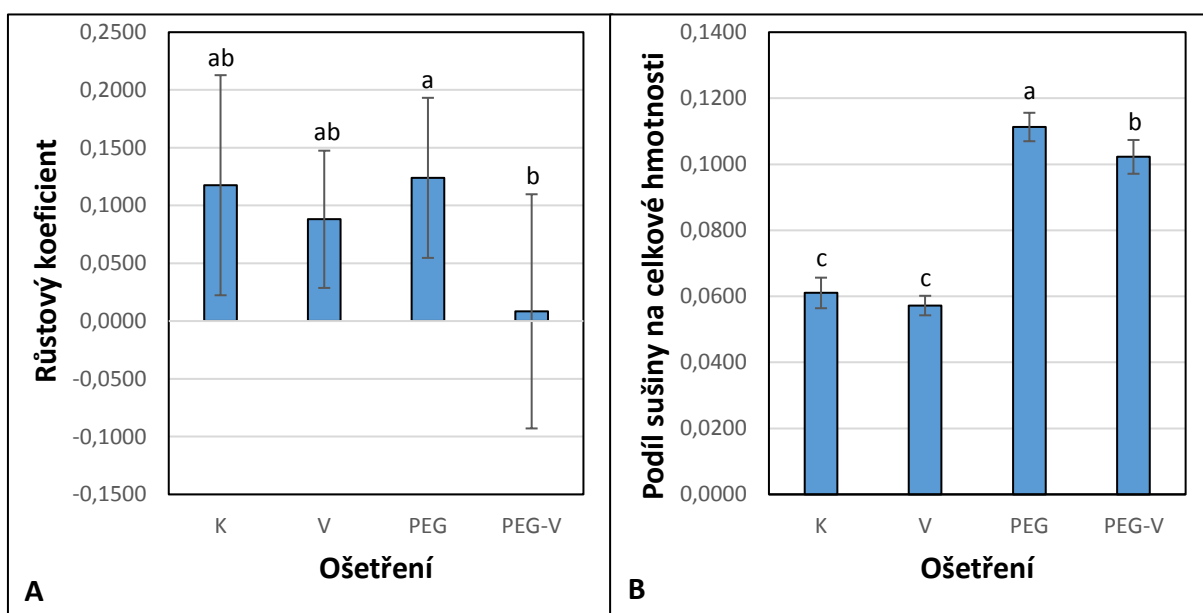


Graf 21: Obsah a zastoupení endogenních sacharidů v kalusech *F. vesca* po 10 dnech působení osmotického stresu a aplikaci validamycinu A.

A – obsah sacharidů v sušině; B – zastoupení jednotlivých sacharidů v sacharidovém spektru; K – MS medium; KV – MS medium + 150 μM validamycinu A; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; PEGV – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000 + 150 μM validamycinu A; N3 - neidentifikovaný sacharid; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena nad sloupky znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 8.

4.8. Vliv aplikace validamycinu A na vybrané charakteristiky kalusové kultury *F. vesca*

Vzhledem k výraznému ovlivnění rostlin aplikací validamycinu A byl v následujícím pokusu zjišťován vliv obdobného ošetření na obsah sacharidů a růst kalusů v optimálních podmínkách i při stresu. Samotný validamycin A způsoboval u kalusů mírnou tendenci ke zvýšení obsahu sacharidů oproti kontrole, zatímco u kalusů na mediu s PEG byla tendence při aplikaci validamycinu A opačná (graf 21A). Co se týče složení sacharidového spektra, nedošlo u žádného ošetření k výrazným změnám (graf 21B). Růst kalusů bez validamycinu A byl téměř shodný u kontroly i osmotického stresu. Při aplikaci validamycinu A byl v optimálních podmínkách zřetelný trend ke zpomalení růstu, průkazně byl však růst omezen pouze při kombinaci působení validamycinu A a osmotického stresu (graf 22A). Obsah vody v kalusech byl při osmotickém stresu stejně jako v předchozích experimentech snížen (graf 22B). Aplikace validamycinu A toto snížení mírně omezila (graf 22B).



Graf 22: Růstový koeficient a podíl sušiny na čerstvé hmotnosti u kalusů *F. vesca* po 10 dnech působení osmotického stresu a aplikaci validamycinu A.

A – růstový koeficient vypočítaný jako (konečná čerstvá hmotnost - počáteční čerstvá hmotnost) / počáteční čerstvá hmotnost; B – podíl sušiny na čerstvé hmotnosti vypočítaný jako suchá hmotnost / čerstvá hmotnost; K – MS medium; KV – MS medium + 150 μ M validamycinu A; PEG – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000; PEGV – MS medium + 6% polyethylenglykol 4000 + 150 μ M validamycinu A; chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; rozdílná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha=0,05$, one-way ANOVA; n = 8.

5. Diskuse

Rostliny z rodu *Fragaria* jsou díky jednoduchému pěstování, relativně malému vzrůstu a možnosti snadného vegetativního i generativního množení dobrým modelovým organismem (Davik et al. 2013), který v poslední době získává na popularitě. Existují ale i nevýhody tohoto materiálu. Jednou z nich je vysoká variabilita v odpovědi na působení vnějších faktorů, zejména abiotických stresů, která byla pozorována mezi jednotlivými druhy (Darrow 1966), ale i mezi jednotlivými ekotypy (Davik et al. 2013) či kultivary (Grant et al. 2010; Klamkowski & Treder 2008). V této práci se vysoká variabilita v odpovědi na abiotické stresy projevila u *F. vesca* i v rámci jedné populace, a to dokonce i mezi geneticky totožnými rostlinami získanými klonálním množením. Nehomogenní stresová reakce se u většiny sledovaných parametrů projevila velkým rozptylem získaných hodnot, což vedlo k nízké statistické významnosti získaných výsledků a ztížení jejich interpretace.

Rostliny také velmi citlivě reagovaly na kultivační podmínky, jejichž nastavení mělo výrazný vliv na výsledný fenotyp. Při kultivaci v klimaboxu byly jahodníky spíše drobné, měly dlouhé řapíky a malé, sytě zelené listové čepele. Naproti tomu při kultivaci v kultivační místnosti, byly mohutnější, s kratšími řapíky a většími, světle zelenými listovými čepelemi. Rozdíl mezi oběma zmíněnými kultivačními prostory byl v teplotě a ozáření. Nicméně teplotní rozdíl byl pouze 2 °C, a je tedy pravděpodobné, že hlavním faktorem určujícím výsledný fenotyp rostlin byla ozářenost. Ta byla výrazně vyšší v kultivační místnosti, kde množství fotosynteticky aktivního záření dosahovalo 50 $\mu\text{mol fotonů/m}^2/\text{s}$, zatímco v klimaboxu se množství tohoto záření pohybovalo mezi 9 a 23 $\mu\text{mol fotonů/m}^2/\text{s}$. Není překvapivé, že při vyšší ozářenosti jahodníky rostly rychleji a tvořily více biomasy. Na druhou stranu v těchto podmínkách častěji docházelo k hnědnutí a odumírání listů, což mohlo být ovšem způsobeno častějším kontaktem listů se stěnou baňky v důsledku větší velikosti. Možný je však i negativní dopad vysoké ozářenosti. Citlivost na světlo byla u jahodníků pozorována při neplánovaném několikadenním vystavení rostlin nepřetržitému osvětlení, ke kterému došlo následkem poruchy v kultivační místnosti. U rostlin docházelo k výrazným chlorózám a nekrotickým listům a je pravděpodobné, že po delší době by došlo k odumření celých rostlin. Zdá se tedy, že *F. vesca* je v tomto ohledu možné zařadit mezi druhy netolerující trvalé osvětlení, jako je například *Solanum melongena*, *Arachis hypogaea*, *Geranium sp.* a další (Velez-Ramirez et al. 2011).

Pro získání většího množství geneticky uniformního materiálu v kratším čase bylo využito vegetativního množení *in vitro*. Byly vyzkoušeny dva různé postupy. Prvním byla regenerace prýtů z listových segmentů indukovaná pomocí thidiazuronu v koncentraci 0,881 mg/l (4 μ M). Tato metoda byla již dříve úspěšně použita u *F. × ananassa* (Haddadi et al. 2003). U *F. vesca* se ale v našem případě příliš neosvědčila, protože vedla spíše k tvorbě kalusu. Druhým postupem bylo zmnožení prýtů rostlin indukované pomocí růstových regulátorů 6-benzylaminopurinu a kyseliny giberelové, každého v koncentraci 2 mg/l. Tato metoda, původně také použitá u *F. × ananassa* (Sharma et al. 2012), vedla k dobrým výsledkům i u *F. vesca*, a proto byla nadále využívána pro množení experimentálního materiálu.

Jak bylo již řečeno, odpověď jahodníků na stres byla velmi různorodá, což se projevilo i při srovnávání jednotlivých experimentů. V reakci na zasolení byla v prvním experimentu vidět mírná tendence ke zvýšení obsahu sacharidů a ve druhém naopak ke snížení. Oba experimenty se lišily délkou působení stresu, což mohlo být jednou z příčin rozporupných výsledků. V obou případech byl ale rozdíl obsahu sacharidů oproti kontrole velmi malý a statisticky neprůkazný, což naznačuje, že zasolení zřejmě nemá výrazný vliv na obsah sacharidů v listech *F. vesca*. V dostupné literatuře bohužel informace o vlivu zasolení na sacharidový metabolismus jahodníků chybí. Pouze u dvou kultivarů *F. × ananassa* ('Elasanta' a 'Korona') byl měřen obsah rozpustných sacharidů v plodech při zavlažování 80 mM NaCl. I zde ale zůstávalo množství sacharidů beze změny (Keutgen & Pawelzik 2008). Podobný rozpor ve výsledcích mezi prvním a druhým experimentem byl pozorován i u působení osmotického stresu vyvolaného aplikací PEG. V tomto případě byly ale rozdíly obsahu sacharidů oproti kontrole výrazně větší a v prvním experimentu navíc i průkazné. Zdá se tedy, že toto ošetření mělo na obsah rozpustných sacharidů v listech vliv. Navíc byl v rostlinách rostoucích na mediu s PEG v jednom z experimentů zjištěn výrazný trend ke zvýšení obsahu malondialdehydu, který je jedním z nejčastěji využívaných ukazatelů míry oxidativního stresu (Devasagayam et al. 2003). To překvapivě naznačuje, že samotný osmotický stres způsoboval vyšší oxidativní poškození, než zasolení, kombinující osmotický stres s iontovou toxicitou. Na základě výše zmíněných zjištění z prvních dvou experimentů, byl další výzkum zaměřen převážně na působení osmotického stresu vyvolaného pomocí PEG. Dalším, i když ne klíčovým důvodem, proč nebyl podrobněji zkoumán vliv zasolení, byly technické problémy při analýze vzorků obsahujících NaCl, které snižovaly přesnost, a tedy i výpovědní hodnotu výsledků.

V následujících dvou experimentech (číslo 3 a 4) byl prověřen vliv délky působení osmotického stresu na obsah sacharidů v listech *F. vesca*. V obou případech bylo zaznamenáno kolísání obsahu sacharidů v průběhu působení stresu. Ovšem průběh trendu byl v každém z případů v podstatě opačný. V experimentu číslo 4 byla nejdříve patrná tendence k poklesu množství sacharidů a v konečné fázi kultivace pak naopak k nárůstu. To odpovídá výsledkům z prvních dvou pokusů, kdy při desetidenním působení osmotického stresu měl obsah sacharidů také tendenci klesat a při třicetidenním působení byl naopak průkazně zvýšen. V experimentu číslo 3 však byly změny v těchto časech opačné, tedy po 10 dnech byl patrný trend ke zvýšení obsahu sacharidů a po 30 dnech naopak ke snížení. Je velmi složité vyvozovat závěry na základě těchto rozporuplných a neprůkazných výsledků. Ale když zahrneme i experiment číslo 5, s desetidenním působením osmotického stresu, vidíme, že ve třech případech ze čtyř měl obsah sacharidů po kratší době působení osmotického stresu tendenci klesat. Ve dvou případech ze tří se pak obsah sacharidů po delší době působení stresu naopak spíše zvyšoval, v jednom případě dokonce průkazně. Tento průběh změn se tedy zdá být pravděpodobnější. Konzistentní v tomto ohledu nejsou ani údaje z literatury, kde se opět projevuje velká variabilita způsobená různými kultivary jahodníku i odlišným nastavením experimentů. U *F. × ananassa* cv. ‘Toyonoka’ byl například pozorován nárůst obsahu rozpustných sacharidů v průběhu 10 dnů působení sucha (Sun et al. 2015; Sun et al. 2013). U kultivaru ‘Elsanta’ bylo při pozvolném vysychání substrátu pozorováno také zvýšení obsahu sacharidů, ovšem až po 40. dni kultivace (Razavi et al. 2008). A při 30 denním působení sucha na kultivary ‘253/29’, ‘279/4’ a ‘279/5’ bylo u jednoho z nich zaznamenáno mírné zvýšení obsahu glukosy, fruktosy a sacharosy v listech a u zbylých dvou spíše snížení (Giné-Bordonaba & Terry 2016). Rozdíl v reakci během časně a pozdější fáze působení osmotického stresu může souviset s teorií, že časná odpověď zajišťuje okamžité přežití rostlin, zatímco aklimace, způsobující nové metabolické a strukturální schopnosti, pomáhá zlepšit fyziologický stav rostliny při stresu (Chaves et al. 2002; Bohnert & Sheveleva 1998). U *F. vesca* pak bylo popsáno, že aklimační proces může trvat až několik měsíců (Sønsteby & Heide 2011). Společným znakem pro všechny experimenty s osmotickým stresem bylo zvyšování poměru obsahu hexos k obsahu sacharosy. Ve třech případech bylo toto zvýšení dokonce signifikantní (experiment 1, 2 a 4) a je tedy možné, že hraje určitou roli v reakci jahodníků na snížení obsahu vody v listech, které bylo při aplikaci PEG do media také pozorováno. Dalším společným znakem takto ošetřených rostlin bylo výrazné omezení růstu, což potvrzuje vhodnost zvolené míry stresu, který byl dostatečně intenzivní, aby vyvolal

pozorovatelnou fyziologickou reakci, ale zároveň ho byly rostliny schopné dlouhodobě přežívat.

Samotné působení chladu v experimentu číslo 2 nezpůsobilo téměř žádné změny v celkovém obsahu rozpustných sacharidů ani ve složení sacharidového spektra. V experimentu číslo 4 pak bylo možné pozorovat tendenci k mírnému zvýšení obsahu sacharidů, které se alejevilo pouze jako přechodné. V literatuře je dobře zdokumentováno zvyšování obsahu sacharidů při chladové aklimaci jahodníků. U *F. vesca* došlo po 10 dnech při 2 °C k více než 2,5 násobnému zvýšení obsahu glukosy a fruktosy (Rohloff et al. 2012) a u *F. × ananassa* cv. 'Korona' k obdobnému zvýšení obsahu glukosy, fruktosy i sacharosy (Koehler et al. 2015). Působení chladu v našich experimentech bylo ale krátkodobější (pouze v noci, po dobu 3 až 5 dní) a i teplota byla vyšší (10 až 12 °C). Zdá se, že pro rostliny *F. vesca*, schopné bez aklimace přežívat až -6 °C (Sønsteby & Heide 2011) nebylo takovéto ošetření samo o sobě dostačující pro indukci výraznější stresové odpovědi. Mírnost použitého chladového stresu dokumentuje i to, že růst rostlin, které mu byly vystaveny, se vyrovnal růstu rostlin kontrolních.

Při kombinaci chladu se zasolením byl u jahodníků pozorovatelný obdobný trend ke snížení obsahu sacharidů jako u zasolení samotného. Současné působení obou stresů tento trend pouze o něco zesílilo. Při kombinaci chladu s osmotickým stresem vyvolaným pomocí PEG, byla ale reakce rostlin v obou experimentech (č. 2 a 4) průkazně odlišná od samotného působení osmotického stresu. Ten způsoboval po 10 a 12 dnech kultivace snižování obsahu sacharidů, zatímco při současném působení chladu byl zaznamenán naopak nárůst. Pokud vezmeme v úvahu, že chlad a osmotický stres jsou hlavními faktory indukujícími chladovou aklimaci (Rajashekar & Panda 2014), která podle dostupných údajů u *F. vesca* zahrnuje zvyšování obsahu sacharidů (Rohloff et al. 2012), je možné, že v případě našich experimentů kombinace obou stresů způsobila nástup chladové aklimace, a tedy i zvyšování obsahu sacharidů již po 10 dnech působení. Zatímco při samotném osmotickém stresu bylo pro vyvolání stejné reakce potřeba působení výrazně delší, a proto byl nárůst obsahu sacharidů v tomto případě pozorován až po 30 dnech kultivace. Spolu se zvyšováním obsahu sacharidů byl pak při kombinaci obou stresů zaznamenán i nárůst poměru obsahu hexos k obsahu sacharidů, což přispívá k této teorii, protože hexosy jsou u *F. vesca* údajně nejvíce akumulovanými sacharidy při chladové aklimaci (Rohloff et al. 2012).

Významnými signálními molekulami, uplatňujícími se v regulaci sacharidového metabolismu a stresové odpovědi rostlin, jsou disacharid trehalosa a její prekurzor trehalosa-

6-fosfát (Zhang et al. 2009; Baena-González et al. 2007; Schluepmann et al. 2004; Müller et al. 2000; Wingler et al. 2000). Validamycin A je specifickým inhibitorem enzymu trehalasy. Tento enzym hydrolyzuje trehalosu a následkem jeho inhibice je tedy logicky zvýšení obsahu trehalosy a trehalosa-6-fosfátu v rostlinách (Schluepmann et al. 2004; Goddijn et al. 1997). Aplikace validamycinu A do media způsobila u rostlin jahodníků, rostoucích v optimálních podmínkách, mírnou tendenci ke snížení obsahu rozpustných sacharidů a také k omezení růstu. Tyto efekty by bylo možné vysvětlit signálními funkcemi popsány u trehalosy a trehalosa-6-fosfátu (Schluepmann et al. 2004; Wingler et al. 2000). Jednou z těchto funkcí byla také indukce syntézy škrobu, což mělo za následek snížení obsahu rozpustných sacharidů a jejich nedostatek v sinkových pletivech způsobující omezení růstu. Při současném působení osmotického stresu a validamycinu A měl obsah rozpustných sacharidů překvapivě tendenci se spíše zvyšovat. Zdá se tedy, že kombinace těchto dvou faktorů, osmotického stresu a zásahu do sacharidového metabolismu, by mohla vyvolávat odlišnou reakci než jednotlivé faktory zvlášť. K lepšímu pochopení této reakce by jistě přispělo měření změn obsahu škrobu v listech, které zatím nebylo provedeno. Nicméně zdá se, že zvýšení obsahu trehalosy při stresu není pro jahodníky nijak benefiční, protože růst rostlin ošetřených validamycinem A nevykazoval při stresu žádné zlepšení.

Fotoautotrofní kultivace měla pozitivní vliv na růst jahodníků. I když výsledky nejsou kvůli velkému rozptylu hodnot statisticky průkazné, už z pozorování prostým okem bylo zřetelné, že rostliny kultivované pod uzávěry sun cap měly větší přírůstky oproti rostlinám kultivovaným za mixotrofních podmínek v alobalem uzavřených baňkách. Zajímavé bylo, že při fotoautotrofní kultivaci měly jahodníky i navzdory absenci sacharidu v mediu stejný obsah rozpustných sacharidů v listech jako při kultivaci na mediu se 3 % sacharosy. Při stejném experimentu s rostlinami tabáku a bramboru byl totiž u obou druhů pozorován výrazně nižší obsah sacharidů v listech při fotoautotrofní kultivaci ve srovnání s kultivací klasickou (Ševčíková et al. 2016 nepublikované výsledky). Obsah sacharidů u plně fotosyntetizujících jahodníků navíc zůstával téměř nezměněný i po 30 dnech kultivace, zatímco u mixotrofních kultur byla zřetelná tendence k poklesu, zřejmě v důsledku postupného vyčerpání sacharosy z media. Obsah vody ve fotoautotrofních a mixotrofních kulturách byl srovnatelný i po 30 dnech kultivace, což naznačuje, že zvýšená difuze plynů ani po delší době nezpůsobovala vysychání rostlin.

Odvození kalusové kultury se ukázalo být u jahodníku velmi jednoduché. Byla vyzkoušena dvě různá indukční media. Prvním bylo MS medium s přidavkem kyseliny

naftyloctové a kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové, obou v koncentraci 1 mg/l. Tato kombinace růstových regulátorů byla již dříve používána pro indukci kalusu u tabáku (Suchomelová-Mašková et al. 2008). V druhém případě bylo použito MS medium s přidavkem kyseliny naftyloctové v koncentraci 4 mg/l a 6-benzylaminopurinu v koncentraci 2 mg/l, které se v minulosti osvědčilo pro indukci kalusu u ořešáku královského (Avilés et al. 2009). Vznik kalusů byl indukován oběma testovanými medii, i když s odlišnou mírou úspěšnosti. Jako efektivnější se ukázalo druhé z výše popsanych medií. V několika případech však došlo jeho působením ke vzniku kořenů na kalusech. Tento problém byl odstraněn zvýšením koncentrace BAP z 2 mg/l na 2,5 mg/l. Rychlý růst kalusů umožňoval získat dostatečné množství materiálu pro experimenty během několika měsíců, a vzhledem ke kultivaci kalusů v trvalé tmě také odpadla možnost ovlivnění jejich růstu rozdílnou ozářeností.

V prvním experimentu provedeném na heterotrofních kalusových kulturách *F. vesca* byla testována schopnost příjmu a utilizace různých sacharidů těmito kulturami. Kalusy se na první pohled velmi lišily od rostlin v obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů. Většina sacharosy přijímané z media byla štěpena na glukosu a fruktosu, které ve výsledku tvořily převážnou část sacharidového spektra. Celkový obsah sacharidů byl pak u kalusů až několikanásobně vyšší než u rostlin. Při zdvojnásobení koncentrace sacharosy v mediu došlo k výraznému zvýšení obsahu sacharidů v kalusech, ale toto zvýšení nebylo dvojnásobné. Zdá se tedy, že kalusy již nebyly schopny tak velké množství sacharidů přijmout. Nejlepší růst kalusů byl zaznamenán na mediu se 3 % sacharosy a na mediu s kombinací 1,5 % sacharosy a 1,5 % sorbitolu. Mírná tendence ke zhoršenému růstu byla patrná u kalusů na mediu se 3 % sorbitolu. To ukazuje, že sorbitol není zřejmě pro jejich výživu stejně vhodný jako sacharosa, nicméně kultury ho dokáží ve větším množství přijímat i zpracovávat. Těmto závěrům odpovídají i literární údaje o metabolismu sorbitolu u jahodníků. Již před delší dobou u nich byla potvrzena přítomnost enzymů syntézy a degradace sorbitolu (Sutsawat et al. 2008; Duangsrissai et al. 2007), navzdory tomu ale jahodníky přirozeně obsahují sorbitol pouze jako minoritní složku sacharidového spektra a hlavními rozpustnými sacharidy jsou sacharosa, glukosa a fruktosa (Sutsawat et al. 2008; Ogiwara et al. 1998). Tendence k výrazně zhoršenému růstu kalusů byla zaznamenána na mediu se 6 % sacharosy, z čehož vyplývá, že příliš vysoká koncentrace tohoto sacharidu v mediu je pro kalusy spíše škodlivá. Možným vysvětlením pozorovaného negativního efektu na růst je osmotický stres způsobovaný takto vysokou koncentrací sacharosy, čemuž nasvědčuje i výrazné snížení obsahu vody v kalusech pěstovaných na tomto mediu. K obdobným výsledkům a závěrům došli i Gerdakaneh et al.

(2010), při pěstování kalusů *F. × ananassa* na mediu se zvýšeným obsahem sacharosy. Podobný osmotický efekt zvýšené koncentrace sacharidů byl navíc již dříve pozorován a využíván i u jiných rostlin (Peres et al. 2009; Gonçalves & Romano 2007).

Dále byl na kalusech také testován vliv vybraných abiotických stresů či jejich kombinace, aby bylo možné porovnat stresovou odpověď kalusů a rostlin. Reakce kalusů na osmotický stres vyvolaný polyethylenglykolem byla na rozdíl od celistvých rostlin konzistentní mezi experimenty a navíc neměnná v čase. Již po třech dnech působení tohoto stresu došlo k výraznému snížení obsahu hexos a jejich množství následně zůstalo v podstatě konstantní až do 30. dne kultivace. Omezení růstu u kalusů nebylo zdaleka tak výrazné jako u rostlin. Přírůstky čerstvé hmotnosti byly sice o něco nižší než u kontroly, ale rozdíly nebyly průkazné. Vezmeme-li navíc v úvahu výrazné snížení obsahu vody v kalusech způsobené osmotickým stresem, je zřejmé, že přírůstek sušiny byl ovlivněn jen minimálně. Z toho lze usuzovat, že kalusy se na rozdíl od celistvých rostlin dokázaly s tímto stresem poměrně dobře vyrovnat. Mechanismem aklimace ale v tomto případě určitě nebylo osmotické přizpůsobení pomocí sacharidů. Spíše se zdá, že sacharidy byly intenzivněji využívány pro energetické dotování jiné obranné reakce. Možný je také vliv signální funkce sacharidů, jejíž pleiotropní efekt na změny v metabolismu byl již v literatuře zdokumentován (Tarkowski & Van den Ende 2015).

Zasolení u kalusů způsobilo omezení růstu a mírný trend ke zvýšení obsahu sacharidů, který byl způsoben téměř výhradně nárůstem obsahu neidentifikovaného sacharidu (N3). Zvýšení jeho množství bylo pozorováno i při kombinovaném působení zasolení a chladu a také u kalusů rostoucích na mediu se 6 % sacharosy a 3 % sorbitolu. Naopak u rostlin nebyl tento sacharid detekován vůbec, a to při žádném z použitých ošetření. Původní domněnkou bylo, že se jedná o galaktinol, jehož výrazná akumulace byla u *F. vesca* pozorována při chladové aklimaci (Rohloff et al. 2012). Při ověřování ale sacharid N3 nekomigroval na systému HPLC s galaktinolovým standardem a tato domněnka byla vyvrácena. Nadále tedy zůstává otázkou, o jaký sacharid se jedná a jaká je jeho možná role ve stresové odpovědi kalusů *F. vesca*.

Samotné působení chladu mělo u kalusů podobně jako u rostlin jen minimální efekt, který se v tomto případě projevil nepatrnou tendencí ke snížením obsahu sacharidů a k omezení růstu kalusů. Kombinace chladu s osmotickým stresem pak měla na obsah sacharidů v podstatě stejný vliv jako působení samostatného osmotického stresu. Zde je opět vidět rozpor s reakcí celistvých rostlin, kde kombinace obou stresů způsobila reakci opačnou.

Pokud ale u kalusů nedochází, na rozdíl od rostlin, k osmotickému přizpůsobení pomocí sacharidů ani po delší době působení osmotického stresu, není překvapivé, že k němu nedošlo ani zde. Jinými slovy, pokud kombinace stresů u rostlin pouze urychluje aklimační reakci, která u kalusů vůbec nenastává, nelze očekávat, že se vliv této kombinace u kalusů výrazněji projeví.

I u kalusů byl zkoumán vliv validamycinu A na růst a obsahy sacharidů. V optimálních podmínkách způsobil validamycin A mírný trend ke zvýšení obsahu sacharidů a při působení osmotického stresu zase k jeho snížení. Na první pohled se tedy zdá, že došlo opět v podstatě k opačné reakci než u rostlin. Nicméně výsledky v tomto případě nejsou průkazné a rozpor tak může být vzhledem k velkému rozptylu hodnot pouze zdánlivý. Zajímavé je, že růst kalusů na mediu s PEG byl v tomto experimentu srovnatelný s kontrolou, zatímco působení validamycinu A v kombinaci s osmotickým stresem růst značně omezilo.

Ze získaných výsledků je zřejmé, že kalusy *F. vesca* reagují na vnější vlivy odlišně než celistvé rostliny pěstované *in vitro* a jejich reakce bude tedy diametrálně odlišná od rostlin v polních podmínkách. Nicméně jejich nespornou výhodou je nižší variabilita této odpovědi, umožňující získat konzistentnější výsledky. Značně odlišná od polních podmínek je ostatně i klasická mixotrofní kultivace rostlin *in vitro*, která sama o sobě způsobuje určitou míru stresu. Jako vhodná alternativa se v tomto případě jeví kultivace pod uzávěry sun cap, která kombinuje přirozenou autotrofní výživu rostlin s výhodami kultivace *in vitro*. Jahodníky na autotrofní kultivaci *in vitro* reagují velmi dobře a vzhledem ke stoupající oblibě jejich využití jako modelové rostliny má tento způsob kultivace jistě velký potenciál využití.

6. Závěry

Reakce rostlin *F. vesca* na abiotické stresy je velmi nehomogenní, a to i v rámci geneticky uniformní populace, což ztěžuje získání statisticky významných výsledků. Nicméně při působení osmotického stresu bylo prokázáno, že reakce rostlin zahrnuje mimo jiné i změny v obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů, konkrétně zvýšení poměru obsahu hexos k obsahu sacharosy.

Kalusové kultury *F. vesca* také reagují na testované abiotické stresy změnami v obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů a poskytují konzistentnější výsledky, ale jejich reakce je odlišná ve srovnání s celistvými rostlinami. Při působení osmotického stresu bylo hlavní průkaznou změnou snížení celkového obsahu sacharidů.

Reakce na kombinaci stresů, konkrétně chladu s osmotickým stresem, byla u rostlin *F. vesca* průkazně odlišná od reakce na samotný osmotický stres.

Působení validamycinu A nemělo u rostlin ani kalusových kultur průkazný vliv na změny v sacharidovém metabolismu a nevedlo ke zvýšení stresové odolnosti. U kalusových kultur pak dokonce způsobilo omezení růstu při osmotickém stresu.

7. Seznam použité literatury

- Albro, P.W., Corbett, J.T. & Schroeder, J.L., 1986. Application of the thiobarbiturate assay to the measurement of lipid peroxidation products in microsomes. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 13(3), pp.185–194.
- Alsheikh, M.K., Heyen, B.J. & Randall, S.K., 2003. Ion Binding Properties of the Dehydrin ERD14 Are Dependent upon Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), pp.40882–40889.
- Avilés, F. et al., 2009. Effect of Culture Medium in Callogenesis from Adult Walnut Leaves (*Juglans regia* L.). *Chilean journal of agricultural research*, 69(September), pp.460–467.
- Baena-González, E. et al., 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448(7156), pp.938–42.
- Bies-Ethève, N. et al., 2008. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 67(1-2), pp.107–124.
- Bohnert, H.J. & Sheveleva, E., 1998. Plant stress adaptations - making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(3), pp.267–274.
- Cattivelli, L. et al., 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, 105(1-2), pp.1–14.
- Cook, D. et al., 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42), pp.15243–8.
- Darrow, G., 1966. Climate and the strawberry. In: *The Strawberry. Holt, Rinehart and Winston, New York, NY, pp*, pp.355–365.
- Davik, J. et al., 2013. Dehydrin, alcohol dehydrogenase, and central metabolite levels are associated with cold tolerance in diploid strawberry (*Fragaria* spp.). *Planta*, 237(1), pp.265–277.
- Devasagayam, T.P. a, Boloor, K.K. & Ramasarma, T., 2003. Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 40(5), pp.300–308.
- Doherty, C.J. et al., 2009. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *The Plant cell*, 21(3), pp.972–84.

- Duangrisai, S. et al., 2007. Presence and expression of NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase and sorbitol-6-phosphate dehydrogenase genes in strawberry. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(2), pp.191–198.
- Fowler, S. & Thomashow, M.F., 2002. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant cell*, 14(8), pp.1675–90.
- Gerdakaneh, M. et al., 2010. The effects of exogenous proline and osmotic stress on morpho-biochemical parameters of strawberry callus. *African Journal of Biotechnology*, 9(25), pp.3775–3779.
- Ghaderi, N. & Siosemardeh, A., 2011. Response to drought stress of two strawberry cultivars (cv. Kurdistan and Selva). *Horticulture Environment and Biotechnology*, 52(1), pp.6–12.
- Giné-Bordonaba, J. & Terry, L.A., 2016. Effect of deficit irrigation and methyl jasmonate application on the composition of strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit and leaves. *Scientia Horticulturae*, 199, pp.63–70.
- Goddijn, O.J.M. et al., 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant physiology*, 113(1), pp.181–90.
- Gonçalves, S. & Romano, A., 2007. In vitro minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. *Biologia Plantarum*, 51(4), pp.795–798.
- Grant, O.M. et al., 2012. Physiological and growth responses to water deficits in cultivated strawberry (*Fragaria*×*ananassa*) and in one of its progenitors, *Fragaria chiloensis*. *Environmental and Experimental Botany*, 83, pp.23–32.
- Grant, O.M. et al., 2010. Physiological and morphological diversity of cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) in response to water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 68(3), pp.264–272.
- Guy, C. et al., 2008. Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 132(2), pp.220–235.
- Guy, C.L., Huber, J.L. & Huber, S.C., 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant physiology*, 100, pp.502–508.
- Haddadi, F. et al., 2003. Thidiazuron- and Zeatin-induced High-frequency Shoot Regeneration from Leaf and Shoot-tip Explants of Strawberry. *HortTechnology*, 23(3), pp.276–281.
- Hameed, M. & Ashraf, M., 2008. Physiological and biochemical adaptations of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. from the Salt Range (Pakistan) to salinity stress. *Flora: Morphology*,

- Distribution, Functional Ecology of Plants*, 203(8), pp.683–694.
- Hannah, M. a et al., 2006. Natural Genetic Variation of Freezing Tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 142(September), pp.98–112.
- Hara, M., Fujinaga, M. & Kuboi, T., 2004. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(7-8), pp.657–662.
- Hirakawa, H. et al., 2014. Dissection of the octoploid strawberry genome by deep sequencing of the genomes of fragaria species. *DNA Research*, 21(2), pp.169–181.
- Hodges, D.M. et al., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), pp.604–611.
- Houde, M. et al., 2004. Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnology Journal*, 2(5), pp.381–387.
- Hsiao, T.C. et al., 1976. Water stress, growth, and osmotic adjustment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 273(927), pp.479–500.
- Hubbard, N.L. et al., 1991. Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Phvsilogia Plantarum*, 82, pp.191–196.
- Hummel, R.L. & Moore, P.P., 1997. Freeze resistance of Pacific Northwest strawberry flowers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122(2), pp.179–182.
- Hummer, K.E., Bassil, N. & Njuguna, W., 2011. Chapte 2 Fragaria. In: Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: Temperate fruits. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, pp.17–44.
- Chaves, M.M. et al., 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 89(SPEC. ISS.), pp.907–916.
- Chinnusamy, V. et al., 2003. ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in arabidopsis. *Genes and Development*, 17(8), pp.1043–1054.
- Kaplan, F. et al., 2007. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant Journal*, 50(6), pp.967–981.
- Keutgen, A.J. & Pawelzik, E., 2008. Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. *Food Chemistry*, 107(4), pp.1413–1420.
- Klamkowski, K. & Treder, W., 2006. Morphological and Physiological Responses of

- Strawberry Plants to Water Stress. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 71(4), pp.159–165.
- Klamkowski, K. & Treder, W., 2008. Response to drought stress of three strawberry cultivars grown under greenhouse conditions. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16, pp.179–188.
- Koehler, G. et al., 2015. Integrative “omic” analysis reveals distinctive cold responses in leaves and roots of strawberry, *Fragaria × ananassa* “Korona.” *Frontiers in Plant Science*, 6(October), pp.1–21.
- Koehler, G. et al., 2012. Proteomic Study of Low-Temperature Responses in Strawberry Cultivars (*Fragaria x ananassa*) That Differ in Cold Tolerance. *Plant Physiology*, 159(4), pp.1787–1805.
- Kurz, M., 2008. Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers. *Saline systems*, 4, p.6.
- Lang, V. et al., 1994. Alterations in Water Status, Endogenous Absciscic Acid Content, and Expression of rab18 Gene during the Development of Freezing Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, 104(4), pp.1341–1349.
- Liston, A., Cronn, R. & Ashman, T.L., 2014. *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany*, 101(10), pp.1686–1699.
- Liu, F. et al., 2007. Water relations and yield of lysimeter-grown strawberries under limited irrigation. *Scientia Horticulturae*, 111(2), pp.128–132.
- Liu, Q. et al., 1998. Two Transcription Factors , DREB1 and DREB2 , with an EREBP / AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low- Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(8), pp.1391–1406.
- Livingston, D.P. & Henson, C. a., 1998. Apoplastic Sugars, Fructans, Fructan Exohydrolase, and Invertase in Winter Oat: Responses to Second-Phase Cold Hardening. *Plant physiology*, 116(1), pp.403–408.
- Martínez-Ferri, E. et al., 2016. Water relations, growth and physiological response of seven strawberry cultivars (*Fragaria ananassa* Duch.) to different water availability. *Agricultural Water Management*, 164, pp.73–82.
- Maughan, T.L., Black, B.L. & Drost, D., 2015. Critical temperature for sub-lethal cold injury of strawberry leaves. *Scientia Horticulturae*, 183, pp.8–12.

- Medina, J. et al., 1999. The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant physiology*, 119(2), pp.463–470.
- Müller, J. et al., 2000. Disaccharide-mediated regulation of sucrose:fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant physiology*, 123(1), pp.265–74.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, pp.473–497.
- Murshed, R., Lopez-Lauri, F. & Sallanón, H., 2013. Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum lycopersicon* L, cv. Micro-tom). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(3), pp.363–378.
- Nestby, R. & Bjorgum, R., 1999. Freeze injury to strawberry plants as evaluated by crown tissue browning, regrowth and yield parameters. *Scientia Horticulturae*, 81(3), pp.321–329.
- Ogiwara, I. et al., 1998. Variation in Sugar Content in Fruit of Four Strawberry Cultivars Grown in the Field and under Forced Culture, Harvest Years, and Maturation Stages. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 67(3), pp.400–405.
- Oosumi, T. et al., 2006. High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*, 223(6), pp.1219–1230.
- Owens, C.L. et al., 2002. CBF1 Orthologs in Sour Cherry and Strawberry and the Heterologous Expression of CBF1 in Strawberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127(4), pp.489–494.
- Palonen, P. & Buszard, D., 1997. Current state of cold hardiness research on fruit crops. *Canadian Journal of Plant Science*, 77, pp.399–420.
- Peres, L.E., Zsögön, A. & Kerbauy, G., 2009. Abscisic acid and auxin accumulation in *Catsetum fimbriatum* roots growing in vitro with high sucrose and mannitol content. *Biologia Plantarum*, 53(3), pp.560–564.
- Quick, W. et al., 1992. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell and Environment*, 15(1), pp.25–35.
- Rajashekar, C.B. & Panda, M., 2014. Water stress is a component of cold acclimation process essential for inducing full freezing tolerance in strawberry. *Scientia Horticulturae*, 174(1), pp.54–59.

- Raunkiaer, C.C., 1934. *The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography*, Oxford: Oxford University Press.
- Razavi, F. et al., 2011. A method for testing drought tolerance in *Fragaria* based on fast screening for water deficit response and use of associated AFLP and EST candidate gene markers. *Euphytica*, 180(3), pp.385–409.
- Razavi, F. et al., 2008. Chlorophyll fluorescence as a tool for evaluation of drought stress in strawberry. *Photosynthetica*, 46(4), pp.631–633.
- Reyes, J.L. et al., 2008. Functional dissection of Hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, Cell and Environment*, 31(12), pp.1781–1790.
- Rivarola, M. et al., 2011. Abiotic Stress-Related Expressed Sequence Tags from the Diploid Strawberry *Fragaria vesca* f. *semperflorens*. *The Plant Genome Journal*, 4(April 2016), p.12.
- Rizhsky, L. et al., 2004. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology*, 134(April), pp.1683–1696.
- Rizhsky, L., Liang, H. & Mittler, R., 2002. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant physiology*, 130(November), pp.1143–1151.
- Rohloff, J. et al., 2012. Metabolite profiling reveals novel multi-level cold responses in the diploid model *Fragaria vesca* (woodland strawberry). *Phytochemistry*, 77, pp.99–109.
- Rousseau-Gueutin, M. et al., 2008. Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. *Genetics*, 179(4), pp.2045–2060.
- Rousseau-Gueutin, M. et al., 2009. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51(3), pp.515–530.
- Ruelland, E. et al., 2009. Chapter 2 Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants. *Advances in Botanical Research*, 49(C), pp.35–150.
- Sasaki, H. et al., 2001. Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 158(7), pp.847–852.
- Sharma, P. & Dubey, R.S., 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 46(3),

pp.209–221.

- Sharma, S. et al., 2012. Cultivation of strawberry (*Fragaria X Ananassa* Duch.) cv . Chandler in specific climatic conditions of Jammu (J & K). 1 : Mass propagation. *Journal of Cell and Tissue Research*, 12(3), pp.3367–3372.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K., 2006. Global Analysis of Gene Networks to Solve Complex Abiotic Stress Responses. In T. H. H. Chen, M. Uemura, & S. Fujikawa, eds. *Cold Hardiness in Plants-Molecular Genetics Cell Biology and Physiology*. Wallingford: CABI Publishing, pp. 1–10.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), pp.217–223.
- Shulaev, V. et al., 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics*, 43(2), pp.109–116.
- Schluepmann, H. et al., 2004. Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. *Plant physiology*, 135(June), pp.879–890.
- Schulze, W.X. et al., 2011. Cold acclimation induces changes in Arabidopsis tonoplast protein abundance and activity and alters phosphorylation of tonoplast monosaccharide transporters. *Plant Journal*, 69(3), pp.529–541.
- Sønsteby, A. & Heide, O.M., 2011. Environmental regulation of dormancy and frost hardiness in Norwegian populations of wood strawberry (*Fragaria vesca* L.). *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 5, pp.42–48.
- Stitt, M. & Hurry, V., 2002. A plant for all seasons: Alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), pp.199–206.
- Strauss, G., Schurtenberger, P. & Hauser, H., 1986. The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles: stabilization during freeze-thawing and freeze-drying. *Biochimica et Biophysica Acta*, 858(1), pp.169–180.
- Suchomelová-Mašková, P., Novák, O. & Lipavská, H., 2008. Tobacco cells transformed with the fission yeast Spcdc25 mitotic inducer display growth and morphological characteristics as well as starch and sugar status evocable by cytokinin application. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(7), pp.673–684.
- Sun, C. et al., 2013. Effects of salicylic acid on physiological characteristics of strawberry

- leaves under drought stress. *European Journal of Horticultural Science*, 78(3), pp.106–111.
- Sun, C. et al., 2015. Proline , Sugars , and Antioxidant Enzymes Respond to Drought Stress in the Leaves of Strawberry Plants. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 33(May), pp.625–632.
- Sutsawat, D. et al., 2008. Properties of sorbitol dehydrogenase in strawberry fruit and enhancement of the activity by fructose and auxin. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 77(3), pp.318–323.
- Tarkowski, Ł.P. & Van den Ende, W., 2015. Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. *Frontiers in plant science*, 6(April), p.203.
- Thomashow, M.F., 2010. Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant physiology*, 154(2), pp.571–577.
- Timasheff, S.N., 2002. Protein Hydration , Thermodynamic Binding , and Preferential Hydration. *Biochemistry*, 41(46), pp.13473–13482.
- Turhan, E. et al., 2012. Apoplastic antioxidant enzymes in the leaves of two strawberry cultivars and their relationship to cold-hardiness. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(2), pp.114–122.
- Turhan, E., 2012. Seasonal alteration of sugar metabolism in strawberry (*Fragaria × ananassa*) plants during cold-acclimated and non-acclimated stages. *African Journal of Biotechnology*, 11(20), pp.4558–4565.
- Velez-Ramirez, A.I. et al., 2011. Plants under continuous light. *Trends in Plant Science*, 16(6), pp.310–318.
- Warmund, M.R., 1993. Ice Distribution in Earliglow Strawberry Crowns and Tissue Recovery Following Extracellular Freezing. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(5), pp.644–648.
- Wingler, A. et al., 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in Arabidopsis. *Plant physiology*, 124(1), pp.105–14.
- Xue, L., Dai, H. & Lei, J., 2015. Creating high polyploidy pink-flowered strawberries with improved cold tolerance. *Euphytica*, 206(2), pp.417–426.
- Yang, T. et al., 2005. Transcriptional regulation network of cold-responsive genes in higher plants. *Plant Science*, 169(6), pp.987–995.
- Zhang, B. & Archbold, D.D., 1993. Solute Accumulation in Leaves of a *Fragaria chiloensis* and a *F. virginiana* Selection Responds to Water Deficit Stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*,

118(2), pp.280–285.

Zhang, Y. et al., 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant physiology*, 149(4), pp.1860–71.